

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA INDUCCIÓN DE
CALLOS EMBRIOGÈNICOS EN GENOTIPOS HÍBRIDOS DE COCO, *Cocos
nucífera* L. (ARECALES: ARECACEAE) A PARTIR DE CULTIVO *In vitro* DE
INFLORESCENCIAS INMADURAS.**

GERMÁN ANDRÉS AGUILERA ARANGO
7515001

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PALMIRA
2012**

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA INDUCCIÓN DE
CALLOS EMBRIOGÈNICOS EN GENOTIPOS HÍBRIDOS DE COCO, *Cocos
nucífera* L. (ARECALES: ARECACEAE) A PARTIR DE CULTIVO *In vitro* DE
INFLORESCENCIAS INMADURAS.**

GERMÁN ANDRÉS AGUILERA ARANGO

7515001

**Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas,
Línea de investigación Biotecnología Vegetal**

DIRIGIDO POR:

Alonso González Mejía, Ph. D.

Eyder Daniel Gómez López, Ph. D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS

PALMIRA

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

En Palmira a los 10 días del mes de Diciembre de 2012, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores HERNANDO RAMIREZ y ROOSEVELT ESCOBAR PEREZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

GERMAN ANDRÉS AGUILERA ARANGO

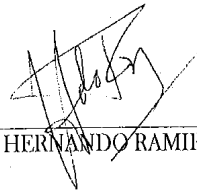
Titulada:

"ESTANDARIZACION DE UNA METODOLOGIA PARA LA INDUCCION DE CALLOS EMBRIOGENICOS EN GENOTIPOS HIBRIDOS DE COCO, cocos nucifera L. (ARECALES : ARECACEA) A PARTIR DE CULTIVO IN VITRO DE INFLORESCENCIAS INMADURAS" bajo la dirección de Eyder Daniel Gómez López, Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes HERNANDO RAMIREZ y ROOSEVELT ESCOBAR PEREZ, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA X

REPROBADA


HERNANDO RAMIREZ


ROOSEVELT ESCOBAR PEREZ

Dedico este trabajo:

A mis padres Aracelly Arango y German Aguilera por todo el amor y el apoyo incondicional que he recibido por parte de ellos.

A mis hermanos Alexis, Adalberto y Xiomara porque sé que aunque hemos tenido nuestras diferencias, siempre hemos querido lo mejor para cada uno de nosotros y hemos estado juntos para apoyarnos mutuamente.

A familiares y amigos por que han creído en mí y han hecho de este proceso de aprendizaje un camino más fácil de recorrer.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, por aceptarme como estudiante de Maestría en ciencias biológicas y por su excelente calidad académica.

A los Doctores Alonso González Mejía y Eyder Daniel Gómez López por haber aceptado ser mis directores de tesis, por colaborar en la realización de la investigación, y por su ayuda en la revisión del manuscrito.

A la Dra. Prasanthi Perera por el conocimiento impartido en el cultivo de inflorescencias inmaduras en coco.

A María Eugenia Buitrago por ser mi tutora de laboratorio, por las enseñanzas recibidas en el área de cultivo de tejidos, por su disposición y comentarios acertados.

A Roosevelt Escobar, por el asesoramiento en el área de cultivo de tejidos y por el préstamo de las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos en la Unidad Biotecnología.

Al programa de Frutales Tropicales del CIAT por el apoyo logístico durante la realización del estudio, en especial a Alexander Medina y Jorge Delgado.

A los profesores Juan Carlos Vaca, Karina López, Hernando Ramírez, Jhon Ocampo y Nora Cristina Mesa por la formación recibida por parte de cada uno de ellos y por sus recomendaciones.

A Francisco Sánchez Marín, Myriam Cristina Duque y Juan Bosco Cuasquer por su ayuda en la parte del análisis estadístico de resultados.

A mis compañeros y amigos de la Universidad Nacional sede Palmira y CIAT, en especial a Adriana Núñez, Auradela Ríos, Liliana Muñoz, Claudia Zúñiga, Adriana Alzate, Adriana Bohórquez, Harold Suarez, Mónica Rodríguez y Mauricio Martínez.

Al programa MIDAS (USAID), Gobernación de Nariño, Colciencias y CIAT por el financiamiento para llevar a cabo esta investigación.

“La facultad y los jurados de tesis no se hacen responsables de las ideas emitidas por el o los autores de este trabajo”

(Artículo 24, resolución 04 de 1979)

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	18
2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS.....	199
2.2.1 Citogenética y Características Botánicas.....	19
2.3 DIVERSIDAD.....	20
2.3.1 Descriptores morfológicos.....	21
2.3.2 Marcadores moleculares.	24
2.4 ENFERMEDADES DEL COCOTERO EN AMERICA	288
2.4.1 Enfermedad del anillo rojo.	29
2.5. FITOMEJORAMIENTO	32
2.6 BIOTECNOLOGÍA	34
2.7 CULTIVO DE TEJIDOS.....	35
2.7.1 Cultivo de tejidos en coco.....	36
2.8 EMBRIOGÈNESIS SOMÀTICA	40

2.8.1 Aplicaciones de la Embriogénesis Somática.	422
2.8.2 Embriones somáticos.	43
2.9. FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	44
2.9.1 Factores que influyen en la adquisición de la capacidad embriogénica.....	44
2.9.2 Proliferación y mantenimiento de callos embriogénicos.	46
3. OBJETIVOS.....	48
3.1 OBJETIVO GENERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. HIPÓTESIS	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	499
5.1. LOCALIZACIÓN.....	49
5.2. MATERIAL VEGETAL	49
5.3. COLECTA DEL MATERIAL.....	50
5.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	51

5.5. INDUCCIÓN DE LOS CALLOS EMBRIOGÉNICOS SOMÁTICOS	
.....	522
5.6. MEDIO DE CULTIVO	53
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6.1 ENSAYO DE VIABILIDAD	55
6.2 INDUCCION DE CALLOS EMBRIOGENICOS A PARTIR DE	
OVARIOS	60
7. CONCLUSIONES	688
8. RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFIA	711
ANEXOS	85

LISTA DE TABLAS

Pág.

TABLA 1. Porcentaje de callos embriogénicos obtenidos a partir de ovarios inmaduros de tres edades sembrados en medio cri 72 con dos concentraciones diferentes de 2,4-D.....	57
TABLA 2. Análisis de varianza del efecto del medio y de la edad para la obtención de callos embriogénicos.	61
TABLA 3. Análisis de varianza del efecto del medio y de la edad para la obtención de callos embriogénicos.	61
TABLA 4. Análisis de varianza del porcentaje de formación de callos embriogénicos en los diferentes medios evaluados.	63
TABLA 5. Frecuencia de probabilidades para la formación de callos embriogénicos.	64
TABLA 6. Análisis de varianza de máxima verosimilitud para datos no categóricos.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución natural y artificial precolombina del coco..	18
Figura 2. Inflorescencias inmaduras de coco en tres estados de desarrollo.. .	50
Figura 3. Colecta de material vegetal.	51
Figura 4. Ubicación de los explantes.....	51
Figura 5. Procesamiento de las muestras..	52
Figura 6. Extracción de los explantes.....	52
Figura 7. Callo embriogénico de coco obtenido después de 90 días..	56
Figura 8. Callo con alto grado de fenolización, efecto de la concentración de 300 μm de 2,4-d en el medio de cultivo.	59
Figura 9. Porcentaje de formación de callos embriogénicos en tres concentraciones de 2,4-d y carbón activado evaluados en ovarios de tres estados de desarrollo diferentes..	62
Figura 10. Porcentaje de callos embriogénicos obtenidos a partir de ovarios inmaduros de dos edades sembrados en 3 medios con concentraciones de 2,4-d y de carbón activado (C.A.) diferentes.....	66

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Diagrama esquemático del desarrollo de espádices dentro de la corona de la palma de coco.	85
Anexo 2. Componentes del medio 72.....	86

RESUMEN

La producción de coco (*Cocos nucifera* L.) a nivel mundial se caracteriza por presentar bajos niveles tecnológicos; ser cultivado en su mayoría por agricultores de escasos recursos económicos y por la falta de materiales altamente productivos. El uso de híbridos es una alternativa de producción, sin embargo, la multiplicación de material de siembra en grandes proporciones es lenta por vía sexual, por lo tanto se requieren alternativas eficientes de multiplicación de materiales de alta calidad y productividad. La propagación masiva de genotipos seleccionados es difícil de cumplir a través de la propagación natural.

El objetivo de este trabajo es optimizar la inducción de callos embriogénicos como una primera fase de la multiplicación clonal en materiales híbridos de coco, buscando un protocolo eficiente, que sirva como base para obtener un sistema de producción masivo de plántulas de materiales elite, al que puedan acceder los agricultores. Para ello se evaluaron tres estados de inflorescencias inmaduras de coco sembradas en tres concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para la inducción de callos embriogénicos. Se corroboró que la concentración de 2,4-D y carbón activado (C.A.) son fundamentales para el desarrollo de los callos. Además, cuando se cultivan ovarios en un medio que contiene 300 µM de 2,4-D y 0,25% de C.A., se induce callo en un 42,9% de los explantes.

Palabras clave: Coco - *Cocos nucifera* - Callos embriogénicos – Inflorescencias inmaduras – cultivo *In vitro*.

ABSTRACT

Coconut (*Cocos nucifera* L.) production worldwide is characterized by low levels of technology present be cultivated by farmers mostly low income and lack of highly productive. The use of hybrid production is an alternative; however, the multiplication of planting material in large proportions is slow through sex. Therefore require efficient alternatives propagating materials of high quality and productivity. The mass propagation of selected genotypes is difficult to achieve through natural spread.

The objective of this work is to optimize embryogenic callus induction as a first phase of clonal propagation in coconut hybrid materials, seeking an efficient protocol to serve as the basis for a system of mass production of seedlings of elite materials, which farmers can access. We evaluated three states of immature inflorescences of coconut grown in three concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for induction of embryogenic callus. It was confirmed that the concentration of 2, 4-D and activated carbon (A.C.) are essential for the development of corns. Furthermore, when cultured ovarian medium containing 300 µM of 2, 4-D and 0.25% A.C., explants result in 42,9% tripe.

Keywords: Coconut - *Cocos nucifera* – embryogenic callus – immature inflorescences – *In vitro* culture.

1. INTRODUCCIÓN

La producción de coco a nivel mundial se caracteriza principalmente por presentar bajos niveles tecnológicos y ser cultivado por productores de escasos recursos económicos. Por lo tanto se requiere buscar alternativas eficientes de multiplicación de materiales de alta calidad y productividad, considerando que la propagación de genotipos seleccionados es difícil de cumplir a través de la propagación natural. El uso de materiales híbridos, es una alternativa de producción, así como una estrategia para responder a los problemas fitosanitarios. Sin embargo, la producción de material de siembra en grandes proporciones es lenta por vía sexual, y se deben buscar nuevas alternativas.

En este sentido, la biotecnología, a través del cultivo de tejidos *In vitro*, puede proporcionar una alternativa para el futuro, debido a su potencial para la propagación masiva. Pero la biotecnología en frutales tropicales especialmente en coco avanza lentamente, y los estudios reportados en cultivo de tejidos para esta especie no son consistentes.

Es así como en investigaciones preliminares realizadas por e; Programa de Frutas tropicales, en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se logró obtener a partir del cultivo de tejidos vegetales y utilizando el protocolo reportado por Pérez-Núñez *et al.*, (2006), la generación de callos embriogénicos somáticos de coco a partir del cultivo de la plúmula. Un inconveniente es que este tejido es de origen cigótico y por ende segrega características genéticas de ambos parentales. Esto condujo a la necesidad de desarrollar un protocolo para la producción de callos embriogénicos somáticos a partir del cultivo de inflorescencias inmaduras, pues se ha demostrado que estas estructuras inducen callos embriogénicos, manteniendo las características de la planta madre y por ende se podría lograr una multiplicación clonal (Perera *et al.*, 2009).

El objetivo de éste trabajo fue optimizar el sistema de embriogénesis somática usando inflorescencias inmaduras, con miras a implementar un sistema de multiplicación clonal para materiales híbridos de siembra en coco.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El coco, *Cocos nucifera* L., es considerado la joya de los trópicos y es sin duda el cultivo arbóreo más importante del mundo. Con alrededor de 12 millones de hectáreas cultivadas en más de 90 países, ayuda a la economía y subsistencia a más de 13 millones de personas relacionadas directa o indirectamente con los productos de esta planta (Bogtoff y Balslev, 1993; Santos, 1999).

Los cultivos de coco establecidos a nivel del trópico, probablemente son el resultado directo o indirecto de la actividad humana. Su dispersión es tan amplia que en la actualidad existe un fuerte debate sobre su centro de origen geográfico. Los límites exactos del área de distribución natural del coco se desconocen, aunque la mayoría de los expertos en el tema creen que se originó dentro de la región Indo-Malaya en el Pacífico Occidental (Opeke, 1982), (Figura 1).

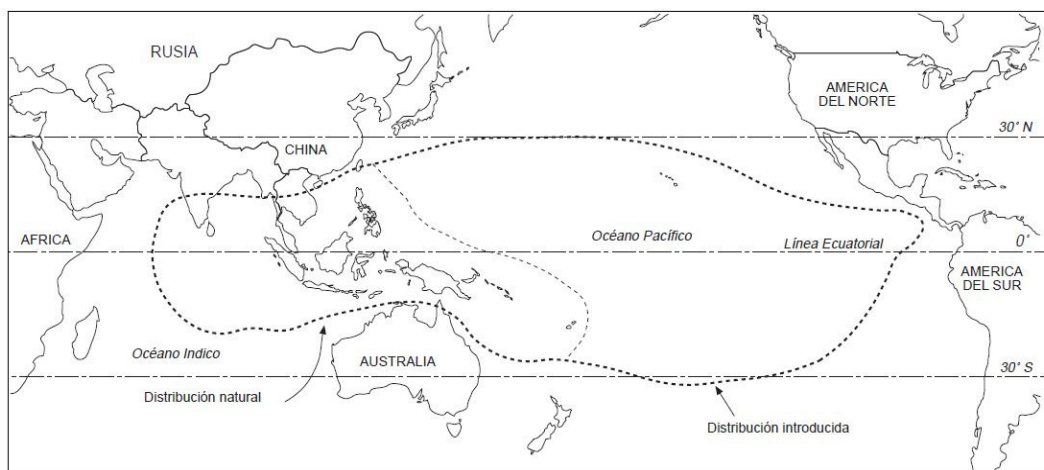


Figura 1. Distribución natural y artificial precolombina del coco. La región interna de menor tamaño representa el área de origen aparente; la región externa representa la distribución artificial antes de 1500 D.C. (Tomado de Parrotta, 1993).

La hipótesis que postula que el coco es de origen insular asiático-pacífico y no de origen tropical americano, se basa en su diversidad genética en esta región

en comparación a la de América (Corner, 1966). La evidencia que apoya la opinión en la cual el coco se originó en la región de Melanesia proviene del descubrimiento de restos fósiles de *C. nucifera* en Nueva Guinea de más de 4.000 años de edad y restos fósiles en Vanuatu de más de 5.000 años de edad (Buckley, 1984).

Estudios de marcadores moleculares microsatélites realizados por Baudouin y Lebrun en 2009, lograron comprobar que el coco llegó a América desde el Sudeste asiático, lo que se conoce actualmente como Las Filipinas, lo cual apoya a los resultados encontrados por Corner en 2006.

2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS

De acuerdo a The International Plant Names Index en el portal de datos del GBIF, www.data.gbif.org, el cocotero presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Arecales
Familia: Arecaceae
Género: *Cocos*
Especie: *Cocos nucifera*

Esta familia incluye unos 200 géneros y 2.450 especies distribuidas en la región tropical, algunas de estas especies se extienden en áreas subtropicales en ambos hemisferios. Además de ser un grupo diverso y ecológicamente importante, los componentes de la familia Arecaceae son útiles al hombre. Por ejemplo, son de gran importancia económica la palma africana aceitera (*Elaeis guineensis*) y la datilera (*Phoenix dactylifera*) (Borchsenius y Moraes, 2006).

2.2.1 Citogenética y Características Botánicas.

El cocotero posee un número cromosómico de $2n = 32$. Mide de 12 a 25 m de alto, siendo su tallo esbelto y estipitoso crece más o menos torcido; a menudo es más ancho en la base, donde puede tener alrededor de 80 cm de diámetro; la porción superior del tronco raramente supera los 30 cm de diámetro (Granados-Sánchez y López-Ríos, 2002).

Sus hojas se agrupan en el ápice formando un penacho. Los pecíolos de 90 a 150 cm de largo se disponen en forma envolvente dando la estructura fibrosa al tallo. Las frondas de las hojas tienen una longitud de 1.8 a 6 m; son pinnadas con folíolos de 60 a 90 cm de largo (Loria, 1993).

Es una planta monoica que tiene flores masculinas y femeninas reunidas en una inflorescencia envuelta por una bráctea o espádice. El fruto es una drupa de tres caras, de 20 a 30 cm de diámetro, que pesa alrededor de 1.5 Kg, con epicarpio brillante, mesocarpio fibroso de color castaño a rojizo y endocarpio lignificado o “nuez” que encierra una sola semilla. Los frutos requieren de 9 a 10 meses para madurar. El endospermo o reserva alimenticia de la semilla está formado por una porción carnosa o albuminosa y un jugo dulce, denominados respectivamente como carne y agua de coco. El endospermo carnoso seco se utiliza para producir la copra (pulpa seca de coco), de la cual se extrae el aceite de coco (Quero, 1994).

2.3 DIVERSIDAD

El coco es una de las pocas especies cultivadas importantes que no tiene parientes silvestres estrechamente relacionadas; por lo tanto todas las variedades de coco constituyen un único acervo genético que se encuentra interaccionando libremente. Esto parece tener una incidencia significativa en la estructura genética actual para esta especie (Batugal *et al.*, 2005).

Según estudios de diversidad genética (Guarino *et al.*, 1998), cada región tiene poblaciones distintas, (descrito comúnmente como ecotipos). Los ecotipos altos son muy variables (alrededor del 60% de la diversidad total se encuentra dentro

de los ecotipos altos en el Pacífico), mientras que los enanos son menos variables, lo que probablemente refleja el hecho de que sean plantas autógamas. Aunque la variación entre ecotipos es básicamente continua, se pueden reconocer algunas diferencias entre las poblaciones que proceden de la Polinesia y el Sudeste asiático. Es posible diferenciar también algunos subgrupos que hacen parte del germoplasma de la Polinesia, en particular, las poblaciones del Pacífico Sur y del Pacífico nororiental.

En 1958 Menon y Pandalai describieron 77 variedades altas provenientes de las siguientes regiones: 15 de Filipinas, 11 de India, 13 de Malasia, 10 de Vietnam, 10 de Nueva Caledonia, 9 de Sri Lanka, 2 de Indonesia, 2 de Seychelles, 1 de Nueva Guinea, 1 de Cochinchina, 1 de Siam, 1 de Fiji y 1 de América; y 17 ecotipos de cocoteros enanos procedentes de: 6 de Filipinas, 5 de la India, 2 de Malasia, 2 de Fiji, 1 de Sri Lanka y 1 de Vietnam.

Para medir la diversidad genética se ha hecho uso de descriptores moleculares y morfológicos.

2.3.1 Descriptores morfológicos.

La morfometría comprende el estudio cuantitativo de la variación morfológica y su covariación con otras variables. Tradicionalmente, en un estudio de morfometría clásica, la morfología, incluyendo los componentes de forma y tamaño, son capturados a partir de un conjunto de variables cuantitativas tales como longitud, ancho, altura entre otras, sobre las cuales se aplican análisis estadísticos multivariados destinados a elucidar el cambio que se produce en el espacio multidimensional y transformarlo en unos pocos parámetros que explican la variación (Batugal *et al.*, 2005).

El análisis morfológico juega un papel importante en muchos estudios de biología, sobre todo en aquellos que tratan de entender el proceso de adaptación. Multitud de procesos biológicos producen diferencias entre los individuos, que pueden indicar los distintos papeles funcionales de las mismas

estructuras, o las diferentes respuestas a determinadas presiones selectivas, así como diferencias en los procesos de crecimiento y desarrollo (Zelditch *et al.*, 2004).

No obstante medir la diversidad con estos descriptores tiene una serie de limitaciones como heredabilidades diferenciales, efectos pleiotrópicos y epistáticos, control poligénico e interacciones genotipo x ambiente, lo que conlleva a que la estimación de la diversidad sea difícil (Sugimura *et al.*, 1997). También hay que tener en cuenta la variación genética, que en la mayoría de las veces no es evidente a nivel fenotípico, de modo que materiales morfológicamente similares pueden ser diferentes genéticamente (Ashburner *et al.*, 1997).

Por ejemplo, Avise (1994), trabajando con 12 poblaciones de cocoteros altos del banco de germoplasma de Nigeria y utilizando un mayor número de características morfológicas y reproductivas no consiguió separar las poblaciones en grupos distintos y homogéneos, teniendo en cuenta que tres de estas poblaciones eran originarias de una localidad bastante distante geográficamente de las restantes. Igualmente de acuerdo a los resultados obtenidos por Lebrun *et al.*, (1998), los caracteres vegetativos como morfología de la planta, tiempo de germinación de las semillas, biología floral, composición física y química del fruto y de las semillas fueron utilizadas en estudios de caracterización genética, sin grandes éxitos.

A pesar de las limitaciones de los marcadores morfológicos, en ocasiones resulta imprescindible conocer y disponer de la variabilidad genética existente dentro de cada especie así como de los parentales silvestres, para poder solucionar los diferentes problemas que pueda presentar esta nuez en cada una de las regiones donde este se cultiva. Es por eso que la caracterización morfológica ha sido considerada un elemento importante en la solución de los problemas relacionados con la productividad de los cultivares comerciales y su adaptación a los cambios climáticos (Ashburner y Harries, 2000).

Zizumbo-Villarreal y Arellano-Morin (1998), estudiaron el patrón de variación morfológica de coco en México. Se analizaron 41 poblaciones con 17 caracteres morfológicos de la nuez. Los componentes principales y un análisis de agrupamiento indicaron cuatro grandes grupos de poblaciones de coco que mostraron una alta similitud con cuatro genotipos diferentes recientemente importados a México de las áreas que podrían ser el origen de las poblaciones de coco mexicanos.

En el estudio anterior, estos cuatro genotipos fueron evaluados con respecto a la enfermedad del amarillamiento letal en Jamaica causada por *Phytoplasma* sp., en donde se observó una susceptibilidad diferencial. Sobre la base de la diferencia en la susceptibilidad de los genotipos de México, el análisis de correlación entre las distancias morfológicas y geográficas mostró una alta correlación positiva que apoya: 1) la evidencia histórica que indica las primeras introducciones de coco provenientes de diferentes regiones del mundo, y 2) que en ambas costas de México dos patrones de dispersión diferentes estuvieron involucrados - continua y en saltos.

Estos resultados sugieren que el impacto de la enfermedad amarillamiento letal en las poblaciones de coco variará dependiendo de la zona específica y el origen de sus cocos.

Además, con el uso de este tipo de descriptores, Ribeiro *et al.*, (1999), evaluó caracteres del fruto en cinco poblaciones de cocotero gigante del Brasil, consiguiendo identificar una población «Gigante de Brasil de Santa Rita».

Otro ejemplo del uso de este tipo de descriptores, es el estudio sobre diversidad fenotípica de genotipos de cocoteros procedentes de las Islas del Océano Pacífico Sur y el Océano Índico basado en caracteres foliares realizado por Arunachalam *et al.*, (2005). Los resultados revelaron diversidad en la colección de germoplasma de cocoteros de estas islas y la contribución que tienen los caracteres envoltura de la hoja y ancho del pecíolo en dicha divergencia. Dichos autores plantean que los caracteres foliares tuvieron un papel importante en el proceso de evolución y adaptación de las palmas de

coco. Igualmente, el conocimiento generado en ese estudio sirve como información complementaria para el desarrollo de colecciones núcleo y otras actividades de manejo de los bancos de genes en el cultivo.

Recientemente, Samsudeen *et al.*, (2006), realizaron una exploración para muestrear la variabilidad dentro de las poblaciones de cocoteros del grupo de Islas de Lakshadweep, India. Este estudio constituye el primer informe de variación intrapoblacional en las variedades de coco Laccadive, donde caracteres del fruto permitieron la identificación de los tipos *niu kafa* y *niu vai*.

Según Harries (1978), el tipo *niu kafa* representa a un grupo de coco ancestral, que evolucionó naturalmente a partir de un tipo de coco silvestre difundido por flotación. El tipo *niu vai* se originó por la selección domestica para el aumento del endospermo y este grupo está muy disperso y cultivado por el hombre.

2.3.2 Marcadores moleculares.

El uso de técnicas moleculares en el estudio de la diversidad genética ha contribuido a una mejor comprensión de la diversidad existente en algunas especies (Karp, 2002; Hodgkin *et al.*, 2001). El incremento en el uso de técnicas moleculares en estudios de diversidad genética se basa en los siguientes hechos:

- Los marcadores moleculares proporcionan estimaciones directas de las frecuencias génicas y genotípicas y puede detectar si las plantas son homocigotas o heterocigotas;
- Las técnicas moleculares permiten analizar gran cantidad de caracteres de manera independiente, mientras que el análisis morfológico permite analizar un menor número, a menudo de dudosa homología;
- Los marcadores moleculares son independientes del medio ambiente (Beckmann y Soller, 1986).

Por tanto, los marcadores moleculares proporcionan un enfoque poderoso para comprender los patrones de distribución de la diversidad genética que se puede utilizar para ajustar la colecta, evaluación y estrategias de mejoramiento a fin de obtener la máxima variación de una población silvestre (Morikawa y Leggett, 1990).

Un aspecto importante lo constituye la selección del tipo de marcador que se empleará, el cual dependerá del objetivo del estudio que se pretende abordar y de la biología de la especie, sin olvidar que todas las técnicas moleculares presentan ventajas y limitaciones y su aplicación dependerá, en última instancia, de la disponibilidad de recursos para ejecutar un sistema de marcadores moleculares dado (Coto, 2005).

Adams *et al.*, (1992), argumentaron que los métodos moleculares usados en muestras de tejido colectado en campo proporcionan una manera eficaz de optimizar la diversidad colectada y minimiza el número de muestras que debían ser mantenidas en bancos de germoplasma. Por esta razón, durante los últimos años, la Red Internacional de Recursos Genéticos en Coco (en inglés The International Coconut Genetic Resources Network y su sigla COGENT) y una serie de otros donantes han apoyado el desarrollo de marcadores moleculares para el coco.

Por ejemplo, un estudio de diversidad genética fue realizado en una muestra que contenía 17 poblaciones diferentes de cocotero del Pacífico, con el empleo de la amplificación aleatoria de ADN polimórfico, más conocida por el acrónimo inglés RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA), usando 14 cebadores. Los resultados mostraron que el 60% de la variabilidad observada se encontraba dentro de las poblaciones (Ashburner *et al.*, 1997).

Por otra parte, la técnica de RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) ha sido usada en el análisis global de accesiones de cocotero para la evaluación de las especies y clasificar la variación en un número definido de subgrupos (Lebrun *et al.*, 1998).

Otra de las técnicas moleculares utilizadas en los estudios de variabilidad genética se basa en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP). Este tipo de marcador molecular se usó para estudiar 42 palmas de cocotero de Sri Lanka, permitiendo detectar mayor variación en las formas altas con respecto a las intermedias y las enanas. Otros resultados interesantes se relacionan con la demostración a nivel molecular de una mayor similitud de los cocoteros del grupo Aurantiaca (intermedios) con los del grupo enano, lo que facilita el manejo del germoplasma y optimiza la selección de progenitores genéticamente divergentes para la realización de cruzamientos (Perera *et al.*, 1998).

Actualmente, uno de los marcadores de mayor popularidad debido a su alto polimorfismo, herencia codominante y reproducibilidad son los microsatélites, conocidos también como secuencias simples repetidas (Simple Sequences Repeats, SSR), los cuales se han utilizado con éxito para detectar y cuantificar la variabilidad genética en la especie *Cocos nucifera* L. (Baudouin y Lebrum, 2002).

Barker *et al.*, (2000), reportaron que la Oficina para el Desarrollo de la Investigación sobre Cultivos Oleaginosos tropicales perennes (en inglés The Bureau for the Development of Research on Tropical Perennial Oil Crops y su sigla BUROTROP) apoyó la investigación hecha por el Centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo (en francés Centre de cooperation internationale en recherche agronomique pour le developpement y su sigla CIRAD) de Francia, en donde se desarrolló un juego de marcadores moleculares microsatélites y un software específico para los países en desarrollo. Como resultado, el juego, que consta de 14 loci microsatélites, fue desarrollado y probado en 681 cocoteros que representan una amplia diversidad. El método permite al usuario comparar la muestra con un conjunto de poblaciones de referencia y clasificar estas poblaciones en orden decreciente de probabilidades para identificar el origen de la muestra. Es una herramienta muy eficiente para estudios de diversidad y la identificación de

accesiones de germoplasma. La transferencia de esta tecnología a los países en los que las colecciones de germoplasma de coco se encuentran, mejorará la eficiencia y reducirá costos en la conservación, caracterización, gestión y utilización de muestras de germoplasma para la obtención de variedades mejoradas (Lebrun *et al.*, 2001).

Con el empleo de los microsatélites, se detectó también polimorfismo en una muestra de 20 poblaciones de cocotero, que contenía ecotipos altos y enanos procedentes del Banco de Germoplasma de Filipinas. Los 38 marcadores SSR utilizados detectaron un total de 198 alelos en dicha muestra (Teulat *et al.*, 2000).

Además, un grupo de ocho combinaciones de cebadores de microsatélites fue utilizado para estudiar los niveles y la distribución de la variabilidad genética en 33 poblaciones de cocotero en Sri Lanka, con el objetivo de formular estrategias futuras de colecta y selección de progenitores de interés para el mejoramiento (Perera *et al.*, 2001). Entre los resultados obtenidos por estos autores se destacan los altos niveles de variación intrapoblacional para la población de cocoterios nativa, lo que sugiere un origen común y la existencia de una base genética estrecha para los cocoterios altos de Sri Lanka, donde solo cuatro poblaciones introducidas se separaron claramente en el dendrograma. La importancia de este resultado se acentúa al conocerse que esta variedad de cocotero es la de mayor explotación comercial.

Otra utilidad que han tenido los microsatélites en cocotero está relacionada con el análisis de paternidad. En este sentido, estos marcadores resultaron útiles en un estudio realizado con 30 progenies de 'Enano de Fiji', propagadas de cinco progenitores y rodeadas por otros cultivares, y fue posible estimar que solamente el 20% de las progenies fueron el resultado de cruzamientos, mientras el 40-46% fueron identificados como posibles autofecundaciones (Meerow *et al.*, 2003).

Asimismo, las herramientas moleculares han sido utilizadas para la construcción de mapas de ligamiento, así como, en la identificación de

marcadores de locus de caracteres cuantitativos (del inglés *Quantitative Trait Locus*, QTL). El primer mapa de ligamiento del cocotero fue presentado por Rohde *et al.*, (1999). Mientras que Herrán *et al.*, (2000) construyeron un mapa de ligamiento a partir de cruces entre genotipos altos y enanos e identificaron QTL para la precocidad de la germinación. Por otra parte, el primer mapa de ligamiento que involucra poblaciones adultas fue presentado por Lebrun *et al.*, (2001), el cual permitió la investigación de QTLs para los componentes del rendimiento. A su vez, Baudouin *et al.*, (2006) investigaron los factores genéticos que controlan los componentes del fruto en cocotero mediante este análisis en una progenie del genotipo alto de las Islas de Rennell.

Por lo tanto actualmente existe un conjunto de herramientas disponible para estimar la diversidad genética antes de la colecta para facilitar la localización de germoplasma y tomar las decisiones adecuadas de conservación.

2.4 ENFERMEDADES DEL COCOTERO EN AMERICA

En la actualidad, el cultivo atraviesa por una problemática compleja cuyo componente principal es la fitosanidad; dentro de este aspecto destacan las enfermedades causadas por virus, viroides y fitoplasmas (Chan and Elevitch, 2006).

La enfermedad más conocida es el amarillamiento letal, la cual fue identificada por primera vez en Jamaica, extendiéndose a otros países en el Caribe y América Central, así como en la Florida (Harrison, 1999). Esta enfermedad es causada por *Phytoplasma sp.*, un organismo perteneciente a la clase *Mollicutes*. Afecta más de 38 especies de palma oriundas del caribe, en donde sus efectos han sido más notables en coco que en otras palmas, debido a su gran abundancia, llegando a matar millones de palmas en los últimos cincuenta años (Oropeza *et al.*, 2011).

Según Chan y Elevitch (2006), muchas otras enfermedades son causadas por oomicetos, y aunque algunas variedades pueden ser más susceptibles a la infección, su incidencia es generalmente indicativo de estados nutricionales deficientes de la planta y condiciones favorables para la enfermedad. Por ejemplo la pudrición radical causada por *Phytophthora palmivora* es una preocupación, ya que normalmente es fatal para la palma de coco. Las condiciones frías y húmedas favorecen su propagación. Este microorganismo tiene una distribución tropical y además de la palma de coco también afecta a otras palmas como la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) y la nuez de betel (*Areca catechu*). En Hawaii, *Phytophthora katsurae*, causa la pudrición de corazón de coco, ocasionando pérdidas hasta del 15% de las palmas de coco.

Algunos protozoos uniflagelados del género *Phytomonas* (Familia Trypanosomatidae) son presuntamente asociados con un grupo de enfermedades en coco, palma aceitera y otras palmas de Centro y Suramérica en países como Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guyana Francesa, Guyana, Nicaragua, Perú, Surinam, Venezuela (Nanden-Amattaram and Parsadi-Sewkaransing, 1989). Esta enfermedad es usualmente conocida como marchitez sorpresiva, cuyos síntomas son una rápida decoloración foliar y decaimiento, ocasionando la pérdida de la palma alrededor de los primeros tres meses después de mostrar sus primeros síntomas de aparición. El patógeno esta normalmente restringido a floema, aunque se ha encontrado su presencia en frutos (Batugal *et al.*, 2005).

Además de las anteriores enfermedades existen otras causada por nematodos y cuya presencia es relevante en zonas como Centro y Suramérica, llegando a ser la principal enfermedad limitante en Colombia. Esta enfermedad conocida como anillo rojo es causada por el nematodo *Bursaphelenchus cocophilus* (Gerber and GIBLIN-Davis 1990)

2.4.1 Enfermedad del anillo rojo.

De acuerdo a Agrios (2005), la enfermedad del anillo rojo se encuentra en países de América tropical, distribuyéndose principalmente desde México hasta Brasil, y en varias de las islas del sur del Caribe. La enfermedad se desarrolla rápidamente en los cocoteros jóvenes 3 a 10 años de edad, causando su muerte alrededor de tres meses después de producida la infección. Las pérdidas por anillo rojo pueden ser severas, ya que alcanzan del 10 al 15% de palmas jóvenes, pero en algunas áreas existen altas tasas de infestación, en donde se han registrado pérdidas de hasta el 60% de las palmas de coco sembradas.

Esta enfermedad debe su nombre a la banda roja circular que se presenta en el tallo de las palmas afectadas (Ferreira et al., 1998). Los síntomas externos del anillo rojo se encuentran confinados a las hojas, las cuales presentan un amarillamiento que va desde la punta de la misma hasta la base de los raquis, tornándose finalmente marrones. Los síntomas foliares comienzan en las hojas más bajas y progresivamente avanzan hacia las de arriba. El síntoma interno es un depósito de antocianina de manera circular en el tejido de la corteza de los órganos afectados. Este anillo es por lo general de color rojo en los cultivares altos, pero puede llegar a ser marrón en cultivares híbridos y enanos. Una característica de esta enfermedad es que el síntoma interno se encuentra totalmente desarrollado cuando los síntomas externos se hacen visibles, lo que hace que el manejo de esta enfermedad sea en la mayoría de las veces difícil (Griffith 1987).

Según Agrios (2005), el agente causal de la enfermedad, *B. cocophilus*, mide aproximadamente 1 mm de largo por 15 μ m de ancho. Pone sus huevos y produce todas las etapas juveniles y los adultos dentro de palmeras infectadas, completando su ciclo de vida entre los 9 - 10 días. La Doctora Francia Varón tiene algunos estudios sobre esto en Colombia.

Gerber y Giblin-Davis (1990) demostraron la asociación de *B. cocophilus*, *Teratorhabditis palmarum* y otras especies de nematodos con los escarabajos *Rhyinchophorus palmarum* y *R. cruentatus*, los cuales podrían estar infestados

internamente por otros nematodos que cohabitan en el intestino con el nematodo del anillo rojo.

Las larvas del escarabajo, que se alimentan de palmeras infectadas por el anillo rojo, pueden ingerir varios cientos de miles de nematodos juveniles, pero sólo unos pocos cientos de estos nematodos sobreviven y pasan a través de la muda, interna o externamente, a la siguiente fase larval o edad adulta del gorgojo. Como las hembras del escarabajo emergen de palmas en descomposición, un pequeño porcentaje de ellas llevan consigo nematodos juveniles en tercera etapa de estadio larval. Las hembras de *R. palmarum* son atraídas no solamente a las palmas enfermas, sino que también ponen sus huevos en las palmeras sanas (Magalhaes *et al.*, 2008).

Según Agrios (2005), si la hembra lleva los nematodos de *B. cocophilus*, puede depositarlos en las heridas que se encuentran en la base de las hojas o entrenudos. Los nematodos luego de pasar por repetidos ciclos de vida y de propagación intercelular en las células del parénquima, tallo, pecíolo y raíces, pueden causar ruptura celular, lo que da origen a una serie de cavidades de coloración naranja a rojo, y una textura seca escamosa en los tejidos enfermos, extendiéndose a la base de las hojas y pecíolos.

El manejo y control del anillo rojo requiere la toma de una serie de medidas integradas a nivel de toda la plantación. El control debe dirigirse a reducir las fuentes de infección del nematodo (palmas afectadas), y la población del insecto vector. A través de varios años de experiencia en el combate de esta enfermedad en Costa Rica, se han definido cinco frentes de acción, que determinan el éxito en reducir la incidencia del anillo rojo a niveles económicamente manejables. Estas medidas de control son: organización del personal de fitosanidad, eliminación de palmas con síntomas, reducción de los sitios de cría del insecto vector, reducción de la población adulta infestada del vector y trampeo en áreas para resiembra (Chinchilla, 1996).

2.5. FITOMEJORAMIENTO

Los programas de selección masal en cocotero realizados por más de cincuenta años indican que es posible incrementar su productividad utilizando procedimientos de selección en: 1) Huertos, 2) Planta y Frutos y 3) Velocidad de germinación de plántula (Ohler 1999).

En los años setenta se identificaron en Jamaica variedades tolerantes a la enfermedad del amarillamiento letal, como el 'Enano Malayo' Amarillo (EMA, altamente tolerante) y el Alto del Panamá (AP, medianamente tolerante), y se desarrollaron híbridos entre estos dos materiales (EMA x AP) combinando sus cualidades. Por ejemplo los híbridos 'Mapan' de Costa Rica y 'y el Maypan' de Jamaica, son resultado del cruce del 'Enano Malayo' Amarillo por el Alto del Pacífico como padre (Figueroa y Ruiz 2002).

Zizumbo *et al.*, (1999), encontró que a fines de los años ochenta, en respuesta a la epidemia del Amarillamiento letal en la península de Yucatán, se inició un estudio para evaluar el germoplasma presente en México. El análisis de estas poblaciones mostró la existencia de tres ecotipos diferentes en el Pacífico, y los correspondientes al Alto del Atlántico (AA) y al 'Enano Malayo' Amarillo. En 1991, también en México, se establecieron ensayos de resistencia en un área afectada por esta enfermedad para evaluar la tolerancia de las variedades a utilizar en los programas de replantación.

En ese mismo estudio, los resultados mostraron al 'Enano Malayo Amarillo' con el nivel más alto de sobrevivencia (94%) y al Alto del Atlántico con el más bajo (21%), y se encontraron niveles de sobrevivencia de hasta 77% en poblaciones de Alto del Pacífico. Estos materiales ampliamente usados en todo el continente americano, provienen de un proyecto de investigación de más de 20 años, en donde los ensayos de resistencia continúan siendo evaluados 30 años después de la obtención de estos resultados (Roca 2005).

Con base a los resultados obtenidos en el estudio anterior y ante la presencia del Amarillamiento Letal de Cocotero (ALC), en la zona neotropical, se han

hecho grandes importaciones de semillas de variedades tolerantes a la enfermedad como:

- Altos del Pacífico provenientes de Costa Rica, México y El Salvador.
- Enano Malayo' Rojo, 'Enano Malayo' Amarillo e híbridos 'Mapan' y 'Maypan' de Costa Rica y Jamaica.

Por tanto es posible restablecer las densidades de cultivo de las huertas, así como renovar las plantaciones del estado mediante la producción de plantas tolerantes al amarillamiento letal y con alta productividad, en un esquema sostenible a partir de un programa de selección de huertas, plantas madre, frutos y plántulas en vivero, utilizando tanto los conocimientos obtenidos en los últimos años en los programas de investigación, como en los programas internacionales de selección y mejoramiento.

Actualmente en Brasil la mayor parte de las plantaciones de coco provienen de variedades altas y enanas. No obstante en los últimos años la siembra de material híbrido ha ido ganando espacio en donde de las 300.000 ha distribuidas en todo el país, el 10% pertenece a material híbrido. El coco híbrido, resulta del cruzamiento dirigido de materiales altos de Brasil con variedades provenientes del oeste africano y de la polinesia. Una palma de coco híbrida produce en promedio de 150 a 180 frutos por año, teniendo su inicio de producción a nivel comercial a partir de los tres años. Las ventajas en relación con las variedades altas y enanas se deben principalmente a que se pueden sembrar un mayor número de plantas por ha. las cuales producen el doble de frutos, con un mayor tamaño y un gran volumen de agua (<http://www.cohibra.com.br/>).

Sin embargo, la propagación de genotipos seleccionados para satisfacer la demanda en rápido crecimiento, es muy lento y difícil de cumplir a través de la propagación natural (Perera *et al.*, 2007). Por lo tanto, deben ser considerados enfoques alternativos para la rápida propagación y siembra de materiales mejorados. En este sentido, la biotecnología, enfocada principalmente en el cultivo de tejidos *In vitro*, parece proporcionar una alternativa conveniente para

el futuro, debido a su potencial para la propagación clonal masiva en esta especie (Perera *et al.*, 2009).

2.6 BIOTECNOLOGÍA

La biotecnología es un campo investigativo que intenta responder a los desafíos actuales y emergentes que enfrenta la agricultura, como la mala alimentación, la producción inestable y limitada de alimentos, y la disponibilidad restringida de combustible, por lo que se ha recibido una inversión considerable para la mejora de los cultivos más importantes, a través de estas metodologías modernas (Unnevehr *et al.*, 2007; Sticklen, 2008; Takeda y Matsuoka, 2008).

En coco por ejemplo se logró identificar genotipos con alta eficiencia en producción a partir de herramientas biotecnológicas. Esto constituye una base para el análisis de la variación dentro de la población, lo cual ayuda en la planificación de colectas de germoplasma para programas de mejoramiento (Upadhyay *et al.*, 2002).

Por otra parte Perera *et al.*, (2003), lograron identificar por medio de marcadores moleculares, que a partir de las relaciones genéticas existentes entre las diferentes variedades de coco originarias del sureste asiático, es posible obtener híbridos con un incremento en el vigor de la planta.

Sin embargo, la biotecnología no es un tema exento de polémica, ya que cuenta con diferentes reclamos de los beneficios y limitaciones asociadas con las diversas técnicas, especialmente por parte de los pequeños agricultores en los trópicos y subtrópicos (FAO, 2004b).

Además, los costos de aplicaciones de la biotecnología son frecuentemente altos, y esto es una consideración importante cuando el total de fondos disponibles para la promoción de un determinado cultivo es limitado. Son estos costos lo que explican el por qué hasta ahora la biotecnología se ha llevado a cabo en los principales cultivos por parte de las instituciones gubernamentales

de investigación, universidades y centros comerciales de alto y medianos ingresos, en lugar de una gama más amplia de especies en los laboratorios de los países en desarrollo (Dawson *et al.*, 2009).

Aunque muchos consideran que la biotecnología es sinónimo de modificación genética, esto es sólo una parte de un campo de aplicación más amplio (Naylor *et al.*, 2004; Dhlamini, 2006). De hecho, se considera que la biotecnología puede cubrir por lo menos cuatro áreas de trabajo: (I) Caracterización de la diversidad genética por medio de marcadores moleculares, (II) Mapas genéticos, Selección asistida por marcadores, genómica y disciplinas relacionadas con la proteómica y la metabolómica, (III) Producción de organismos genéticamente modificados o transgénicos y (IV) Cultivo de tejidos y Micropropagación, (FAO, 2004a).

2.7 CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *In vitro*, bajo condiciones asépticas controladas (Street 1977; Calva y Ríos 1999). Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Fert y Paul 2000).

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación clonal, tiene actualmente un gran uso debido a la alta demanda por parte de laboratorios de micro propagación que producen plantas a gran escala para el comercio de ornamentales y especies importantes en la agricultura (Brown and Thorpe, 1995; Vengadesan *et al.*, 2002).

2.7.1 Cultivo de tejidos en coco.

Tradicionalmente el germoplasma de cocotero se encuentra mantenido en colecciones *in situ* y *ex situ*. Esta forma de conservación conlleva a elevados costos de manutención y altos riesgos de erosión genética debido principalmente a la exposición del material vegetal al ataque de plagas y enfermedades que han afectado seriamente las colecciones de germoplasma (Borges y Garces, 2006).

Actualmente, el mantenimiento de esta especie se realiza en forma de colecciones en campo; no obstante, la conservación segura de germoplasma de coco es imposible sin considerar las técnicas modernas de conservación a mediano y largo plazo en condiciones *In vitro* (Malaurie *et al.*, 2006).

Las técnicas de cultivo *In vitro* de coco tienen una importante aplicación para la colección, conservación, propagación e intercambio de germoplasma de material libre de plagas y enfermedades, al mismo tiempo que reduce considerablemente los costos de transportación, de manera que todo estudio encaminado al mejoramiento del medio de cultivo para el logro de este objetivo es de extraordinario valor (Borges *et al.*, 2005).

Las técnicas *In vitro* para el manejo de germoplasma de coco son particularmente importantes por dos problemas principales de este cultivo, los cuales están relacionados por una parte con que es una especie que no se propaga vegetativamente de manera natural y por otra parte porque posee una semilla muy grande de naturaleza recalcitrante (Engelmann, 2005).

Además de los problemas anteriormente mencionados, la lenta propagación de esta especie a través de semillas y la escasa disponibilidad de materiales mejorados, son limitantes para la gran demanda que tiene esta nuez. Una alternativa es la propagación clonal del cocotero, mediante la cual se podrán multiplicar los individuos elite en cantidad suficiente para los futuros programas de replantación (Azpeitia *et al.*, 2003).

Durante las últimas décadas, el problema de la clonación de coco ha sido abordado en una serie de centros de investigación en todo el mundo. Sin embargo, el éxito ha sido muy limitado. Esto se debe a una respuesta baja de los tejidos y por lo tanto se clasifica como una de las especies más recalcitrantes de regenerar *In vitro* (Viñas y Jiménez, 2011).

Entre los explantes evaluados para la clonación *In vitro* de este cultivo se incluyen la plúmula (Weerakoon, 2004), raíces (Justin, 1978), hojas tiernas (Buffard-Morel *et al.*, 1988) e inflorescencias inmaduras (Verdeil *et al.*, 1994).

Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos para la clonación de esta especie se encuentra:

- **Cultivo de embriones cigóticos.**

Para Manzanilla (2004), el cultivo de embriones es una de las primeras técnicas de cultivo de tejidos aplicadas al mejoramiento vegetal. Consiste en extraer el embrión de una semilla y posteriormente desarrollarlo bajo condiciones asépticas e *In vitro* hasta que se desarrolle una planta completa para poder trasplantarla al suelo. El principal propósito del cultivo de embriones, es el de recuperar plantas a través de los embriones durante pruebas de hibridación sexual entre plantas de variedades cultivadas y especies distantes (Williams y Maheswaran, 1986).

En coco, el cultivo de embriones se ha utilizado para la colecta e intercambio de germoplasma, debido a que sus semillas presentan grandes dimensiones, aumentando dramáticamente el volumen del material que se colecta y se almacena (Engelmann y Batugal, 2002).

Esta técnica también se ha aplicado para la conservación de germoplasma a largo y mediano plazo (Assy-Bah & Engelmann, 1992, 1993). Sin embargo, la aplicación de este procedimiento requiere del establecimiento de protocolos eficientes para la germinación y desarrollo de los embriones *In vitro* y las

condiciones de aclimatación *In vivo* para el desarrollo de plantas adaptadas a condiciones de campo.

Por ejemplo Calamar y Klerk (2002), aseguran que algunos de los factores que necesitan ser estudiados en el cultivo de embriones, es obtener la formación de un sistema de raíces funcionales *In vitro*, lo que permite una mayor supervivencia de las plantas durante la aclimatación. Ante esto, se tiene conocimiento que el aumento, reducción o eliminación de la sacarosa en el medio de cultivo puede ser decisivo en el éxito de enraizamiento *In vitro* para muchas plantas.

Por otra parte Pech *et al.* (2007) estudiaron el efecto del ácido giberélico sobre la germinación *In vitro* de embriones cigóticos de coco y su conversión en plántulas, los cuales alcanzaron un 85% de germinación en el medio Eeuwens en estado líquido con la adición de 0,46 μM de ácido giberélico al cabo de los 6 meses de cultivo.

Aunque escasos, se han obtenido resultados prometedores con este método en variedades altas y enanas en Brasil (Siqueira *et al.*, 1998; Silva, 2002; Ângelo *et al.*, 2003; Santana y Teixeira, 2004). Sin embargo, se ha observado una gran variabilidad en el rendimiento del cultivo *In vitro* de embriones de coco dentro y entre ecotipos (Ângelo *et al.*, 2003), aunque no está claro qué parte de esta variabilidad es genética o ambiental.

La aclimatación de plántulas obtenidas a partir del cultivo de embriones, ha sido el principal obstáculo en la propagación *In vitro* de muchas especies, incluyendo coco. La transferencia de plántulas que crecen en condiciones controladas, a un entorno en condiciones naturales, debe ser gradual para evitar el estrés, ya que este puede llevar a la pérdida de individuos por la baja tasa de crecimiento (Silva *et al.*, 1995; Souza Junior *et al.*, 2001).

Sin embargo, Talavera *et al.* (2005), encontraron que el cultivo *In vitro* de coco enano malayo amarillo en condiciones de invernadero, y con luz natural, ha promovido un efecto positivo sobre la tasa de supervivencia cuando las

plántulas fueron transferidas a condiciones *Ex vitro* en un sustrato compuesto por arena, arcilla y musgo.

De acuerdo a Chan *et al.*, (1998), lastimosamente existe una desventaja importante en el uso de estos explantes y es que se obtienen clones de palmas con un rendimiento desconocido, debido a la polinización cruzada en el coco, por lo que no se estaría hablando de una clonación real de la planta madre.

- **Micropropagación.**

La micropropagación puede ser considerada como una extensión de la mayoría de métodos de propagación convencional. Cuando los explantes seleccionados son puestos en un adecuado medio de cultivo bajo condiciones específicas, para estimular la producción de brotes y su posterior subcultivo en forma repetitiva, hasta producir una gran cantidad de plántulas, con las características genéticas de la planta madre (Husseeey, 1983). Las principales cualidades de la micropropagación son la rapidez y la multiplicación clonal de genotipos de plantas superiores libres de enfermedades y plagas (Smith y Drew, 1990).

Para cada especie en particular se deben de seguir generalmente dos rutas empíricas básicas para la producción de plantas, por un lado la organogénesis, que consiste en la exposición de los tejidos a balances definidos de auxinas y citoquininas para inducir la formación de órganos diferenciados como brotes.

La otra ruta llamada embriogénesis somática se caracteriza por exponer los explantes a altos niveles de auxinas, para inducir la formación de estructuras embriogénicas (Christianson *et al.*, 1983; Jeannin *et al.*, 1998).

Para coco se han desarrollado varios protocolos de micropropagación, utilizando diferentes fuentes de explantes. Sin embargo, la mayoría de los avances que se han logrado ha sido utilizando hojas, e inflorescencias inmaduras (Karunaratne y Periyapperuma, 1989; Blake y Hornung, 1995; Hornung, 1995).

A partir de estos tejidos se han regenerado plantas clónales con una baja eficiencia. Cuando se cultivan, los explantes desarrollan un callo en partes indiferenciadas a lo que se le ha denominado "calloide" por Brackpool *et al.*, (1986). Esto es seguido por la formación de embriones, que posteriormente germinan y finalmente forman plántulas clónales (Blake y Hornung, 1995).

Aunque sólo se ha logrado un éxito limitado y los protocolos carecen de ser fiables por no ser reproducibles, la técnica más prometedora para la clonación de coco es la embriogénesis somática (Perera *et al.*, 2007).

2.8 EMBRIOGÈNESIS SOMÀTICA

La embriogénesis somática se define como un proceso en el que una estructura bipolar, con un eje radical y uno apical, se asemeja a un embrión cigótico, y se desarrolla a partir de una célula somática, además no tiene conexión vascular con el tejido original (Von Arnold *et al.*, 2002). Los embriones resultantes pueden germinar y se convierten en plántulas.

Haberlandt, en 1902 declaró que era posible hacer crecer exitosamente en forma artificial embriones originados de células vegetativas (Krikorian y Berquam, 1969). Basado en la teoría celular de Schwann y Schleiden, Haberlandt consideró a cada célula como un organismo elemental y estaba convencido de la totipotencia de las células diferenciadas. Sus experimentos de cultivos con células aisladas de hoja sientan los fundamentos del cultivo *In vitro* en general. Sin embargo, no fue hasta 1958 que los embriones somáticos fueron detectados y reconocidos como tales en cultivos *In vitro* gracias a los trabajos independientes de Reinerth, Steward y colaboradores en cultivos derivados de explantes multicelulares de *Daucus carota* (Kohlenbach, 1985).

De acuerdo a Fehér *et al.*, (2003) y a Manzanilla (2004), en algunas especies vegetales uno de los ejemplos más extremos de flexibilidad en el desarrollo, es la capacidad que tienen algunas células, además de los cigotos (embriogénesis

cigótica), de iniciar el desarrollo embrionario a partir de células somáticas (embriogénesis somática).

Se han reportado ejemplos específicos de embriogénesis somática que ocurre "*In Vivo*". Este fenómeno es conocido como una forma de apomixis obligada llamada embrionía adventicia, que se caracteriza por el crecimiento y desarrollo embrionario de células somáticas después de la fertilización (Merkle, 1990).

La embriogénesis somática tiene gran potencial en estudios experimentales y es ampliamente usada en investigación sobre todo en ingeniería genética, modulación de la expresión de genes en el desarrollo de embrional, procesos de diferenciación que se dan en la formación de plantas completas a partir de una célula y procesos de obtención de plantas clónales (Feher *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque es una técnica de avance en micro propagación, presenta problemas en la reconversión a planta comparada con la organogénesis (Smith y Drew, 1990).

Esta técnica se ha dividido en dos fases principales, en la primera las células somáticas adquieren competencia embriogénica y proliferan como células embriogénicas, y en la segunda fase las células muestran su competencia embriogénica y se diferencian finalmente, en embriones somáticos (Jiménez, 2001). Durante la transición de célula somática a embriogénica, éstas tienden a desdiferenciarse, activando su ciclo de división celular y reorganizando su fisiología, metabolismo y expresión de los patrones genéticos (Fehér *et al.*, 2003).

Los embriones somáticos pueden formarse directamente en la superficie de un tejido organizado como hoja, tallo o embriones cigóticos. También pueden hacerlo en forma indirecta, vía formación de un callo o suspensiones celulares (Jiménez, 2001). Para obtener esa desdiferenciación, se requiere que los tejidos experimenten un estrés, que puede ser inducido mediante la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, o provocado por otros factores externos, tales como temperatura, fotoperiodo, niveles subóptimos de nutrientes, presencia de iones de metales pesados o por diferencias en el

potencial osmótico (Dodeman *et al.*, 1997; Reynolds, 1997; Jiménez, 2001; Fehér *et al.*, 2003). La desdiferenciación, en muchos casos, puede estar claramente correlacionada con la respuesta de las células a una auxina exógena, lo que estimula la respuesta embriogénica en varias especies y tipos de explantes (Fehér *et al.*, 2003).

La embriogénesis somática *In vitro* fue reportada con éxito por primera vez en zanahoria y a partir de este momento muchas especies de angiospermas y gimnospermas han sido adicionadas a la lista de éxitos para esta técnica (Gray, 2000).

Algunas plantas que se han logrado multiplicar *In vitro* por medio de la embriogénesis somática son cebolla (*Allium cepa* L.) (Bohanec *et al.*, 1995; Luthar y Bohanec, 1999), batata (*Ipomoea batatas*) (Ruth *et al.*, 1993), lirio (*Lilium cruces*) (Van Tuyl *et al.*, 1991), tulipán (*Tulipa gesneriana*) (Van Creij *et al.*, 2000), maíz (*Zea mays*) (Tang *et al.*, 2006) y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Gurel *et al.*, 2000).

Sin embargo existen también plantas que son recalcitrantes para multiplicar *In vitro*, un ejemplo de ello es el coco. No obstante Perera *et al.*, (2007), indujeron embriogénesis somática por subcultivo de callos, derivados a partir de ovarios inmaduros presentes en las inflorescencias de coco, lo que indica el uso potencial de este tipo de explantes.

2.8.1 Aplicaciones de la Embriogénesis Somática.

La manipulación genética de células tiene un alcance tal, que el nivel alto de refinamiento de las técnicas de regeneración vegetal a partir de cultivos de tejidos es extremadamente importante (Sharp *et al.*, 1980). A este respecto, la embriogénesis somática tiene una serie de ventajas sobre la organogénesis debido a que se obtienen embriones en vez de brotes a partir de una sola célula, los cultivos embriogénicos pueden ser sincronizados y purificados y se pueden obtener cultivos de material homogéneo.

Los cultivos embriogénicos de especies tropicales y subtropicales han sido utilizadas para la propagación, selección *In vitro* a factores bióticos y abióticos, aislamiento y cultivo de protoplastos, transformación genética y estudios de conservación en germoplasma (Litz *et al.*, 1998a). Etienne-Barry *et al.*, (1999), implementaron el uso de bio-reactores de inmersión temporal en especies leñosas, las cuales representan una alternativa para la producción de semillas artificiales.

Ibaki y Murata (2001), reportaron que la automatización de los procesos biotecnológicos puede incrementar el uso de embriogénesis somática para la micropropagación en dos sentidos, como una importante herramienta para la investigación en embriogénesis somática y para mejorar la eficiencia de producción de embriones a un costo reducido.

2.8.2 Embriones somáticos.

Un embrión puede ser definido como el estado multicelular más temprano reconocible de un individuo, que ocurre antes de que se hayan desarrollado las estructuras u órganos característicos de una especie dada. Su desarrollo se debe a que son estructuras nutridas por células vecinas a través de conexiones protoplasmáticas con una alta velocidad de multiplicación (Zimmerman, 1993).

Los embriones somáticos, asexuales o adventicios son los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos, por ende no poseen conexión vascular con el tejido materno (Gray, 2000).

Comparativamente el desarrollo de embriones somáticos y cigóticos en estado temprano, es muy similar en diferentes especies, sin embargo el desarrollo presenta variabilidad en embriones somáticos (Mordhorst *et al.*, 1997).

Los embriones somáticos primarios son utilizados como explantes, para producir embriones somáticos secundarios (Vasic *et al.*, 2001), y la

embriogénesis somática secundaria se puede repetir en varios ciclos, lo que contribuye significativamente a aumentar el rendimiento de la formación de embriones, especialmente en plantas que presentan baja capacidad de producirlos (Raemakers *et al.*, 1995; George, 1996), reportándose incluso, la obtención de embriones en cultivos prolongados de hasta 10 años, en diferentes especies (Martinelli *et al.*, 2001).

La técnica de cultivo *In vitro* de embriones somáticos de coco, tiene importante aplicación para la colección, conservación y propagación clonal, al mismo tiempo que reduce considerablemente los costos de transporte, de manera que todo estudio encaminado al mejoramiento del medio de cultivo para el logro de este objetivo es de extraordinario valor (Borges *et ál.*, 2005).

2.9. FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

2.9.1 Factores que influyen en la adquisición de la capacidad embriogénica.

La adquisición de la capacidad embriogénica en plantas se debe a varios factores intra y extra celulares (De Jong *et al.*, 1993). Se conocen diferentes factores químicos y ambientales que influyen en la embriogénesis somática.

- **Reguladores de crecimiento.**

La adquisición de la totipotencia es el paso crítico en la embriogénesis somática y el factor más importante que la afecta es la aplicación de reguladores de crecimiento, debido a que el uso de auxinas a altas concentraciones es necesario para causar la dediferenciación y estimulación de la totipotencia, ya que este grupo de reguladores son efectivos en inducir embriogénesis somática en un amplio rango de tejidos y estados de desarrollo (Merkle *et al.*, 1990).

Varias auxinas han sido usadas con el propósito de estimular la embriogénesis somática, entre las que se destacan la auxina natural ácido Indolacético (AIA) y otras sintéticas como el ácido naphtalenacético (ANA) y el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (Xing *et al.*, 2000; Cooke *et al.*, 2002).

El 2,4-D es la auxina más eficiente y comúnmente utilizada en cultivo de tejidos para la inducción de embriogénesis somática, ya que estimula la rápida división celular, estimula la proliferación de células pro embriogénicas (Litz *et al.*, 1998b).

- **Genotipo del tejido.**

El genotipo, tipo de explante y estado de desarrollo pueden ser factores determinantes en la habilidad de respuesta comparativa a los reguladores de crecimiento (Merkle *et al.*, 1990).

Por ejemplo en alfalfa la respuesta embriogénica es específica del genotipo y altamente heredable, al parecer, controlada por dos genes codominantes (Kielly y Bowley, 1992).

Nogan *et al.*, (1989), describieron la embriogénesis somática de *Medicago truncatula* como altamente dependiente del genotipo. Esta restricción genotípica inhibe el uso de más fuentes de germoplasma para la introducción de nuevas características genéticas (Das Neves *et al.*, 1999).

Merkle y Battle (2000), reportaron en *Liquidambar styraciflua*, una especie maderable, que la inducción embriogénica es afectada por el genotipo y el explante. En otra especie como el roble, *Quercus robur* L. Endemann y Wilhelm (1999), describieron que tanto el desarrollo del explante como la estacionalidad deben ser considerados como factores limitantes en la inducción de embriogénesis somática.

2.9.2 Proliferación y mantenimiento de callos embriogénicos.

- **Eventos tempranos en presencia de auxinas.**

Si las auxinas son suprimidas en el medio, el proceso de la embriogénesis se detiene en alguna parte antes de pasar del estado globular de los embriones. El punto donde se detiene es más o menos típico para cada una de las líneas de células. En las líneas de células proliferantes de zanahoria se observaron varios estados de desarrollo, desde células indiferenciadas hasta embriones globulares, mientras que otras líneas solo mostraron células indiferenciadas y masas pro embriogénicas (Zimmerman, 1993).

Los efectos en el desarrollo celular por la acción de las auxinas en un explante para la inducción de dediferenciación por un lado y para la formación de callos por el otro, deben ser anotados para cada línea de células. Esta aparente contradicción puede ser entendida si se considera que una vez formados los callos pueden hacerse insensibles al regulador de crecimiento. La sensibilidad a la auxina es recobrada en un estado posterior, cuando los callos en presencia de auxina detienen su avance definitivo y regresan al tejido indiferenciado, debido a que los callos en estado globular no producen auxinas por lo que la embriogénesis procede normalmente (Manzanilla, 2004).

En algunos casos después del estado globular los embriones pueden producir callos. Esto se debe, a la producción y transporte en bloque de las auxinas naturales (ácido indolacético) almacenada a partir del estado globular, lo que en consecuencia trae que los embriones empiecen a producir auxinas y se hacen sensitivas a está comportándose de manera similar a un tejido somático (Zimmerman, 1993).

- **Células proembriogénicas.**

Un tejido sembrado *In vitro* consta de varios tipos de células. Los explantes al ser tratados con reguladores de crecimiento comienzan a dediferenciarse y

proliferar. Para la inducción del estado embriogénico los explantes requieren de extensos ciclos de células proliferando desorganizadamente, la muerte de tejido celular circundante y altos niveles de auxina sintética. En presencia de auxinas endógenas, después de varios días, incluso semanas, una población de células compactas emergen (Nomura y Komamine, 1985). Esas células divididas de manera asimétrica se agrupan en lo que se conocen como masas pro embriogénicas o agrupamientos embriogénicos, de las cuales sobre estas se desarrollan los embriones somáticos (Zimmerman, 1993).

Nomura y Komamine (1985), en cultivos en suspensión determinaron tres tipos diferentes de desarrollo celular de masa pro embriogénicas: las tipo 1 que eran callos de forma esférica que podían diferenciar embriones a una frecuencia cercana al 90%, las tipo 2 que eran células ovaladas que podían diferenciar cerca del 10% de embriones somáticos y las tipo 3 que eran masas elongadas que no diferenciaron embriones.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar una metodología de cultivo *In vitro* para inducir callos embriogénicos somáticos en genotipos híbridos de coco a partir de Inflorescencias inmaduras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la metodología de cultivo de inflorescencias como una alternativa para la propagación clonal en coco.
- Identificar el tipo de explante y el mejor medio para la inducción de callogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras en coco.

4. HIPÓTESIS

- **Hi:** Es posible generar callos embriogénicos somáticos de coco *In vitro* a partir de inflorescencias inmaduras utilizadas como explantes.
- **Ho:** No es posible inducir la callogénesis somática de coco *In vitro*, en materiales híbridos a partir de inflorescencias inmaduras.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. LOCALIZACIÓN

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología del CIAT, ubicado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca (Colombia) entre los 3° 30' Norte y 76° 19' Oeste, a una altura de 965 m.s.n.m., con una precipitación anual promedio de 763 mm, humedad relativa de 78% y una temperatura media anual de 24.5°C.

5.2. MATERIAL VEGETAL

Para este estudio se utilizaron inflorescencias en estados de madurez -3, -4 y -5 (Figura 2), lo que significa que les falta 3, 4 y 5 meses respectivamente para alcanzar el punto de madurez de la inflorescencia, que es cuando se abre. La etapa de desarrollo de cada inflorescencia fue determinada por su posición dentro de la secuencia en la palma (Anexo 1).

La forma de determinar el estado de las inflorescencias se hace observando la última inflorescencia que abrió. A partir de esa inflorescencia se cuenta en sentido de las manecillas del reloj las inflorescencias que estén cerradas, las cuales abrirán de manera natural en ese orden, ya que el crecimiento floral de coco se da en forma elipsoidal.

Las inflorescencias utilizadas provienen de genotipos híbridos de aproximadamente 20 años de edad, colectadas de palmas de coco ubicadas en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) entre Marzo de 2011 y Marzo de 2012. El número de palmas evaluadas para el ensayo preliminar fue de dos individuos, mientras que para la segunda etapa de la investigación se evaluaron 5 palmas.



Figura 2. Inflorescencias Inmaduras de coco en tres estados de desarrollo (-3, -4 y -5) que corresponden a los meses que faltan para su madurez.

5.3. COLECTA DEL MATERIAL

Para coleccionar el material vegetal se debe contar con personal capacitado en trabajo de alturas. La inflorescencia se debe extraer desde la parte más basal sin dañarla, ya que es en este sitio donde se encuentran las flores femeninas. Para ello se debe descolgar al máximo la hoja de la que nace, atando en su base una soga, asegurándose de extraerla sin infringir daño a la palma. (Figura 3).

Una vez extraída la inflorescencia se procede a cicatrizar la herida. La cicatrización se hace con el fin de controlar plagas y enfermedades producidas por el corte. Se prepara una pasta de Mancozeb u Oxicloruro de Cobre en mezcla con alquil polietil alcohol etoxilado y agua para realizar la cicatrización. La cicatrización se realiza aplicando la pasta en cada una de las heridas.



A.

B.

Figura 3. Ilustración 3. Colecta de material vegetal. A. Colecta de inflorescencias en la copa de la palma. B. Amarre de la hoja donde se encuentra cada inflorescencia para infringir menos daño a la palma.

5.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las inflorescencias se desinfestaron con alcohol al 70% para eliminar cualquier resto de contaminación presente en el material vegetal antes de introducir al laboratorio. Posteriormente cada inflorescencia se disectó a lo largo de su eje longitudinal para eliminar la bráctea que contenía la raquis con sus respectivas raquillas. Cada raquilla se dividió en cinco secciones de acuerdo a la región donde se encontraban las flores con sus respectivos explantes (Figura 4).

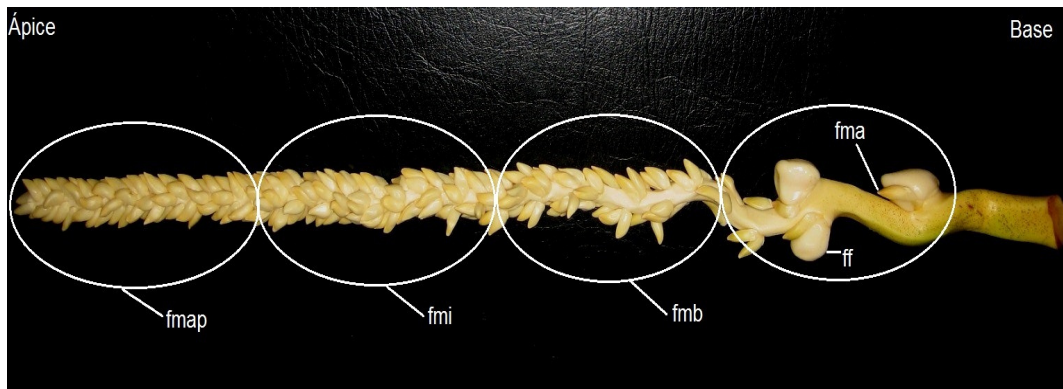


Figura 4. Ubicación de los explantes. Flores femeninas (ff), flores masculinas acompañantes (fma), flores masculinas basales (fmb), flores masculinas intermedias (fmi) y flores masculinas apicales (fmap).

Una vez obtenidas las flores se procedió a desinfectar por inmersión durante doce minutos en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2%. Posteriormente se hicieron cuatro enjuagues de un minuto cada uno con agua estéril en un ambiente

aséptico bajo la cámara de flujo laminar (Edge GARD modelo 19672) (Figura 5).

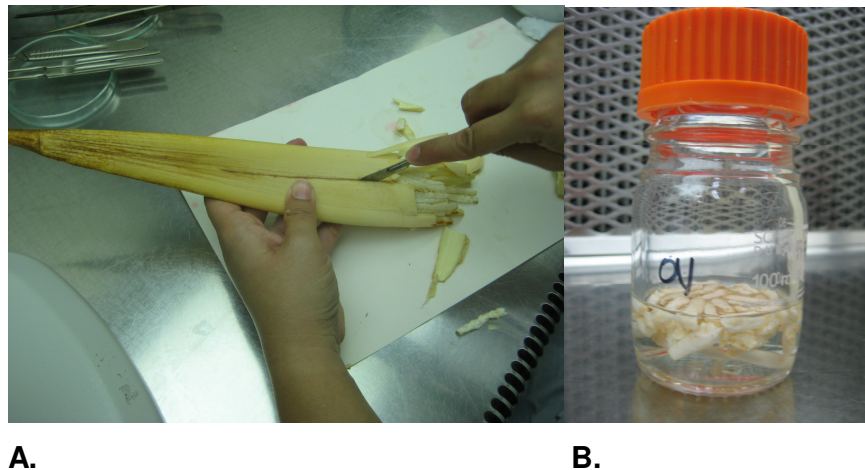


Figura 5. Procesamiento de las muestras. A. Disección de la inflorescencia para extraer los explantes. B. Desinfección de los explantes en cámara de flujo laminar.

Después del tratamiento de desinfección se extrajeron los explantes. Los explantes utilizados fueron ovarios y anteras los cuales se obtenían al eliminar las secciones del perianto de cada flor (Figura 6).

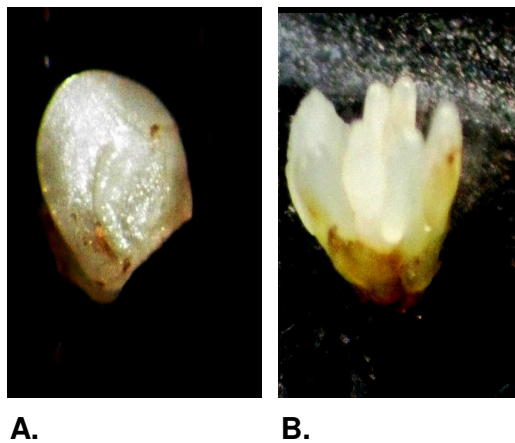


Figura 6. Extracción de los explantes. A. Ovarios. B. Anteras.

5.5. INDUCCIÓN DE LOS CALLOS EMBRIOGÉNICOS SOMÁTICOS

Los explantes, provenientes de cada edad de la inflorescencia, se sembraron en diferentes concentraciones de 2,4-D y carbón activado. Cada tratamiento se aplicó a tres explantes colocados en una caja de Petri (unidad experimental) y

se usaron entre 3 y 8 repeticiones por tratamiento dependiendo de la disponibilidad del material vegetal. Los explantes fueron mantenidos en la oscuridad a $\pm 26^{\circ}\text{C}$ por tres meses.

5.6. MEDIO DE CULTIVO

El medio utilizado para el cultivo de inflorescencias fue el Medio 72 formulado por Karunaratne y Periyapperuma (1989), con sacarosa al 5%, pH ajustado a 5.8 con KOH 0.1 N y HCl 0.1 N con ayuda de un pH metro análogo (Orión modelo 301) antes de solidificarse con 0,2% de Gel Rite (Anexo 2). Posteriormente se esterilizaron en un autoclave (Apollo modelo 29202 L 36) a 121°C durante 20 minutos.

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente se planteó un diseño completamente al azar con dos repeticiones y un arreglo de parcelas sub sub divididas, en donde la parcela principal es el explante que cuenta con cinco niveles (ovarios, anteras acompañantes, anteras basales, anteras medias y anteras apicales), la sub parcela es el medio, representado por la concentración del regulador de crecimiento en tres niveles (100, 200 y 300 μM de 2,4-D), y la sub sub parcela representada por la edad de la inflorescencia, la cual contaba con tres niveles (5, 4 y 3 meses para el punto de maduración).

Del anterior ensayo solo se observó crecimiento en un solo tipo de explante, siendo estos los ovarios, razón por la cual se decidió montar un segundo ensayo bajo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones y un arreglo de parcelas sub divididas en donde la parcela principal es el medio, el cual contó con tres niveles (Medio 1 con concentraciones de 100 μM de 2,4-D y 1% de Carbón activado, Medio 2 con concentraciones de 200 μM de 2,4-D y 1% de Carbón activado y Medio 3 con concentraciones de 300 μM de 2,4-D y 2.5% de

carbón activado) y la sub parcela es la edad de la inflorescencia representada en tres niveles (5, 4 y 3 meses para el punto de maduración).

Cada ensayo tenía un número de réplicas entre siete y ocho, dependiendo de la disponibilidad del material. Cada unidad experimental estuvo representada por una caja Petri con tres explantes o submuestras. Para este ensayo se midió el porcentaje de respuesta que se calcula como:

$$\% \text{ de Callogénesis} = \frac{\text{Número de callos Embriogénicos por tratamiento}}{\text{Número total de explantes por tratamiento}} \times 100$$

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza paramétrico, el cual se complementó con una prueba de promedios múltiples de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Se decidió realizar también un análisis de varianza no paramétrico cuyo objetivo era el identificar de una manera detallada la interacción de la edad con el medio de cultivo.

Para el procesamiento estadístico se utilizó el paquete estadístico S.A.S. (Statistical Analysis System), versión 9,2.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ENSAYO DE VIABILIDAD

Para determinar cuál de los tratamientos presentaba mayor formación de callos embriogénicos se evaluó la interacción del tipo de explante, la edad de la inflorescencia y la concentración del regulador de crecimiento en el medio. Destacaba que de los explantes evaluados, el que mostró mayor formación de callos fueron los ovarios provenientes de las tres edades de inflorescencia sembrados en medio con concentraciones de 100µM y 200µM de 2,4-D, fluctuando estos valores entre 37,8% y 5,3% respectivamente. El crecimiento de este tipo de estructuras se empezó a observar transcurridos 30 días, obteniéndose el máximo crecimiento a los 90 días, además se encontró que si se superaba este tiempo, las estructuras perdían su capacidad embriogénica.

Estudios realizados por Zimmerman en 1993 demuestran que la madurez y el tipo de explante son cruciales para inducir la callogénesis y por lo tanto es importante determinar la etapa de desarrollo más adecuada del explante para el cultivo *In vitro*. Este autor reconoce los callos embriogénicos bien desarrollados por ser masas translúcidas con glóbulos de color blanco perlado, lo cual también se encontró en el presente estudio (Figura 7).

Además de las variables descritas anteriormente, se muestra una diferencia marcada en la producción de callos embriogénicos entre los ovarios colectados a partir de diferentes palmas madre, y esto podría deberse a diferencias en la nutrición, el genotipo y a la madurez del explante.

Pérez-Núñez *et al.*, (2006), reportaron un sistema altamente eficiente de regeneración de palmas de coco mediante embriogénesis somática, usando como explante plúmulas, de las cuales se pueden obtener callos embriogénicos que producen hasta 100.000 embriones somáticos a partir de un solo explante.



Figura 7. Callo embriogénico de coco (*C. nucifera* L.) obtenido después de 90 días a partir del cultivo *In vitro* de ovarios inmaduros. Nótese la formación de masas translúcidas en el centro del callo.

Esto se ha logrado mediante la multiplicación de callos embriogénicos y embriogénesis secundaria. Sin embargo, el uso de plúmulas obtenidas a partir de embriones cigóticos, resultado de la polinización cruzada se oponen a la aplicación de este protocolo para la clonación de palmas con características agronómicas conocidas (Pérez-Núñez *et al.*, 2006).

La obtención de callos embriogénicos en coco a partir del cultivo de inflorescencias inmaduras ya ha sido reportada por varios investigadores (Verdeil *et al.*, 1994; Magnaval *et al.*, 1997; Perera *et al.*, 2007 & Perera *et al.*, 2009). Sin embargo este tipo de explantes provenientes de materiales híbridos no habían sido estudiados anteriormente para determinar su comportamiento *In vitro*, por tal motivo fue necesario evaluar los medios de cultivo descritos, los tipos de explantes y las edades de las inflorescencias para determinar las mejores condiciones de estos genotipos, ya que según Viñas y Jiménez en 2011 la etapa de inducción es un aspecto clave dentro del proceso de la embriogénesis somática de cualquier cultivo.

Si analizamos el resultado de los tratamientos en donde se evidenció crecimiento, se observó que la mejor respuesta se obtuvo con los ovarios de la edad -4 con una concentración de 100µM y 0,1% de Carbón Activado (C.A.), siendo este 37,0%, seguido de los tratamientos con edad -5 y 100µM de 2,4-D

con 0,1% de C.A. (31,1%) y -5 y 200µM de 2,4-D con 0,1% de C.A. (26,7%), mientras que el tratamiento de edad -3 con 200µM de 2,4-D y 0,1% de C.A. fue el que produjo menor cantidad de callos embriogénicos (5,3%) (Tabla 1).

A diferencia de los resultados obtenidos, Perera *et al.* (2007), no hallaron resultados consistentes en cuanto a la influencia del estado de desarrollo del ovario sobre la inducción de callo embriogénico en los diferentes tratamientos utilizados. Según este autor, los ovarios con un estado de desarrollo más avanzado respondieron mejor cuando las concentraciones de auxina fueron mayores (100-200 µM de 2,4-D), mientras que los estados con menor desarrollo respondieron mejor ante concentraciones menores de auxina (50 µM de 2,4-D), lo cual no coincide con la presente investigación, ya que los ovarios con menor desarrollo respondieron mejor a altas concentraciones del regulador de crecimiento.

Tabla 1. Porcentaje de callos embriogénicos obtenidos a partir de ovarios inmaduros de tres edades sembrados en medio CRI 72 con dos concentraciones diferentes de 2,4-D.

Estado de madurez del Ovario	% Callos embriogénicos a 100 µM de 2,4-D	% Callos embriogénicos a 200 µM de 2,4-D
-3	17,2	5,3
-4	37,8	17,8
-5	31,1	26,7

De acuerdo a los resultados consignados en la tabla anterior, se observa que en el medio con 100 µM de 2,4-D es donde se obtienen los mejores resultados, ya que por lo menos para dos edades de la inflorescencia se obtuvieron porcentajes por encima del 30%. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Perera *et al.*, (2007), en donde obtuvieron formación del 41% de callos embriogénicos de coco a partir de ovarios provenientes de inflorescencias con edad -4 sembrados en medio con esta misma concentración de 2,4-D.

El medio 72 ha sido formulado específicamente para el cultivo de tejidos de coco (Karunaratne y Periyapperuma, 1989) y ha sido utilizado con éxito para la inducción de callos y la embriogénesis somática en explantes de coco como embriones inmaduros (Fernando y Gamage, 2000), plúmulas (Fernando *et al.*, 2003) y ovarios (Perera *et al.*, 2007). Sin embargo, en estudios realizados por Perera *et al.*, (2008), este medio no induce una respuesta positiva en la formación de callos embriogénicos a partir de anteras inmaduras para esta especie.

Cuando se evaluaron los otros explantes (las anteras en las diferentes posiciones de la inflorescencia), se identificó que el número de estructuras embriogénicas es prácticamente igual entre ellas, siendo este valor cercano a cero. Lo anterior se debe posiblemente a la falta de aminoácidos en el medio, ya que este tipo de moléculas son esenciales para la androgénesis en coco.

Esto se puede corroborar de acuerdo a lo encontrado por Guo *et al.*, (1999), ya que en el medio Ewens Y3 es posible obtener la formación de callos embriogénicos a partir de anteras, debido a que contiene altos contenidos de asparagina y arginina, además de cloruro de amonio, cloruro de potasio y cloruro de níquel. Además en esa misma investigación se concluyó que la glutamina tiene un efecto positivo en la androgénesis, ya que este aminoácido fue determinante para la obtención de este tipo de estructuras.

Por otro lado Perera *et al.*, (2008), evaluaron tres medios diferentes para la obtención de callos embriogénicos a partir de anteras inmaduras. Los medios evaluados fueron medio MS (Murashige and Skoog, 1962), medio 72 (Karunaratne y Periyapperuma, 1989) y medio Ewens Y3 modificado (Fernando y Gamage, 2000), de los cuales solo se obtuvo crecimiento en el último, corroborando de esta manera que de este tipo de explante no se pueden obtener estructuras embriogénicas en el medio 72, resultados que también se encontraron en este estudio.

Para los ovarios sembrados en concentraciones de 300 μ M de 2,4-D. no hubo crecimiento embriogénico y por el contrario presentaron alto grado de fenolización y necrosamiento (Figura 8).

Esto se debe posiblemente a la relación existente entre el 2,4-D y el carbón activado. Este último componente es esencial para el medio de cultivo de tejido en coco, ya que tiene fuertes propiedades de absorción y sus efectos se atribuyen a la absorción de fenoles y otras sustancias inhibidoras de crecimiento. Sin embargo, también puede absorber reguladores de crecimiento, vitaminas y algunos minerales como el cobre y el zinc (Pan y Staden, 1998).

Lo anterior crea condiciones no definidas de cultivo *In vitro* que podrían conducir a la respuesta del tejido variable, debido a que existen diferencias de absorción de la auxina por parte del carbón activado de acuerdo a la concentración de 2,4-D utilizado (Sáenz *et al.*, 2010).



Figura 8. Callo con alto grado de fenolización, efecto de la concentración de 300 μ M de 2,4-D en el medio de cultivo.

En investigaciones preliminares realizadas por Vidhana and Weerakoon (1997) y Fernando *et al.*, (2003), se observó crecimiento de callos embriogénicos

cuando utilizaron carbón activado en una concentración del 0,25%. Por esto, decidimos realizar una segunda etapa de investigación en donde se utilizarían ovarios inmaduros de las tres edades de inflorescencia y únicamente variando la concentración de carbón activado de 0,1% a 0,25% para la concentración de 2,4-D a 300 μ M.

6.2 INDUCCION DE CALLOS EMBRIOGENICOS A PARTIR DE OVARIOS

En la segunda etapa solo se utilizaron como explantes los ovarios provenientes de las tres inflorescencias sembradas en tres medios con concentraciones diferentes de 2,4-D y carbón activado.

Durante las dos primeras semanas de cultivo, en el medio de inducción de callo, los explantes provenientes de la edad -5 mostraron un aumento en tamaño y volumen, tornándose turgentes para luego dar lugar a la formación de callos con características embriogénicas en un 23,18%. Para las edades de -4 y -3 se presentó un menor desarrollo y poca formación de estructuras embriogénicas, debido al alto grado de fenolización y necrosamiento, arrojando valores de 9,30% y 0,12% respectivamente.

En el transcurso de las cuatro primeras semanas del cultivo de ovarios, algunos tratamientos presentaron la formación de callosidades blancas, los cuales a su vez entre las semanas sexta y octava desarrollaron callos embriogénicos. Los resultados de esta etapa indican, que la diferencia entre tratamientos para la formación de callos embriogénicos a partir de ovarios inmaduros varía cuando los explantes se cultivan en diferentes combinaciones de 2,4-D y carbón activado. Respuestas similares han sido reportadas en palma africana de aceite (*Elaeis guineensis*; Teixeira *et al.*, 1995), en palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.; Al-Khayri y Al-Bahrany, 2004) y en coco (Sáenz *et al.*, 2010).

Según el análisis de varianza, la prueba de Fisher da evidencia para rechazar la hipótesis de igualdad de promedios con relación al medio ($Pr > F = 0,0195$), lo que significa que existen diferencias significativas entre los medios para la

formación de callos embriogénicos. De igual manera se procedió con las edades de las inflorescencias, en donde se encontró que existe evidencia estadística para aceptar la hipótesis alterna ($Pr > F = 0,0028$), lo que significa que algunos promedios relacionados con la edad de la inflorescencia difieren a la probabilidad del 5%. Sin embargo, en los resultados del mismo análisis no se observa interacción edad x medio ($Pr > F = 0,2038$), lo que indica que el medio y la edad son independientes en la expresión de la variable de respuesta (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de varianza del efecto del medio y de la edad para la obtención de callos embriogénicos.

Fuente	D.F.	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Medio	2	0,03169963	0,01584981	5,56	0,0195
Edad	2	0,14154007	0,07077004	7,87	0,0028
Edad*Medio	4	0,05868147	0,01467037	1,63	0,2038

$\bar{X} = 11,24$

C.V. = 12,1%

De acuerdo a lo anterior y según el análisis de varianza para el porcentaje de formación de callos embriogénicos en las edades evaluadas, habría únicamente diferencias significativas en las edades -5 meses y -3 meses, lo que indica que en la edad -5 es más factible obtener callos embriogénicos que en la edad -3. Sin embargo, la edad -4 presenta agrupamiento tanto con la edad -3 como con la edad -5, lo que indica que probablemente esta edad es un estado de transición para la obtención de este tipo de estructuras (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza del efecto del medio y de la edad para la obtención de callos embriogénicos.

Edad	% Formación de Callos Embriogénicos	Agrupamiento de Tukey
-5 meses	22,63	a
-4 meses	9,21	ab
-3 meses	0,67	b

En la prueba de promedios múltiples de Tukey, se comprobó que existen diferencias en la inducción de callos embriogénicos entre las diferentes edades

de los explantes, de acuerdo a los porcentajes obtenidos, que indican que en la edad -5 hay formación de callos embriogénicos independientemente del medio, pero se evidencia que para esta edad la concentración de 300 μ M de 2,4-D y 0,25% de carbón activado se obtuvieron resultados del 41,4%, siendo el tratamiento con mayor cantidad de formación de este tipo de estructuras.

Por el contrario, para la edad -3 la formación de callos en ninguno de los medios alcanzó el 1%, mientras que para la edad -4 existe formación de estas estructuras, pero los porcentajes difieren significativamente de los obtenidos en la edad -5, ya que se obtuvo 41,39% de callos embriogénicos en el medio 3 (Figura 9).

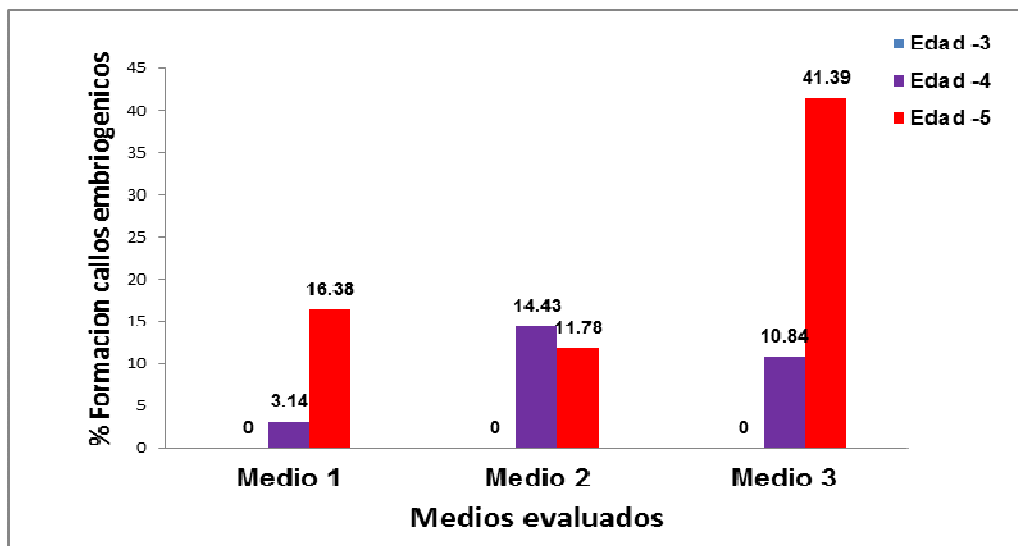


Figura 9. Porcentaje de formación de callos embriogénicos en tres concentraciones de 2,4-D y carbón activado evaluados en ovarios de tres estados de desarrollo diferentes.

Acorde a la Figura 9, parece ser que existe una relación inversamente proporcional entre el desarrollo de la inflorescencia y la capacidad de formación de callos embriogénicos, debido a que respuestas similares se han descrito para otras especies como Chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth; Steinmacher *et al.*, 2007) y trigo (*Triticum aestivum*; Benkirane *et al.*, 2000).

No obstante, en el caso de las inflorescencias inmaduras, los resultados obtenidos al utilizar diferentes estados de desarrollo varían de acuerdo con la especie. Según Verdeil *et al.*, (1994), en estudios realizados en coco,

encontraron que las inflorescencias con mayor respuesta embriogénica fueron aquellas con un mayor desarrollo (tamaño de espata = 45 cm); mientras que en chontaduro fueron las inflorescencias con menor desarrollo (tamaño de espata = 5-8 cm) (Steinmacher *et al.*, 2007).

Además Gueye *et al.*, (2009), aseguran que la capacidad que posee una célula o grupo de células para convertirse en embriogénica también depende de su estado fisiológico y de diferenciación. Los tejidos maduros, por ejemplo, presentan un mayor grado de metilación del ADN, lo que provoca una baja capacidad de dediferenciación (Terzi and Lo Schiavo, 1990).

En el análisis de varianza del porcentaje de formación de callos embriogénicos en los diferentes medios evaluados, se observó que el medio 3 registró mayor potencial embriogénico, aunque resultó estadísticamente semejante al medio 2. En contraste el medio 1 tuvo el menor potencial y fue estadísticamente diferente al medio 3 pero no al medio 2 (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza del porcentaje de formación de callos embriogénicos en los diferentes medios evaluados.

Medio	% Formación de Callos Embriogénicos	Agrupamiento de Tukey
Medio 1	6,75	a
Medio 2	9,82	ab
Medio 3	17,38	b

Los datos consignados en la tabla indican que posiblemente el medio 2 es un medio en donde dependiendo de las concentraciones de 2,4-D y Carbón activado es probable inducir callogénesis embriogénica en coco, pero si se comparan los porcentajes de obtención de estas estructuras con el medio 3, es más factible obtenerlos en el último.

Para este trabajo era primordial encontrar algún tipo de interacción entre la edad y el medio, como una manera de obtener un protocolo eficiente en donde se pudiera identificar el mejor tipo de explante y el mejor medio para la inducción de callogénesis somática en coco; debido a que esta técnica de análisis no

evidenció relación. Por tanto se decidió realizar un ANOVA para datos no paramétricos.

La tabla de frecuencia de respuestas, en donde se midió el efecto de formación de callos a partir de las edades de las inflorescencias y los medios evaluados, no evidenció formación de callos embriogénicos para la edad de -3 meses, razón por la cual se estimaron los parámetros del modelo excluyendo los datos observados para esta edad (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de Probabilidades para la formación de callos embriogénicos.

MUESTRA	NO		SI	
	No.	%	No.	%
	Respuesta	Respuesta	Respuesta	Respuesta
-5 en Medio 1	51	77,27	15	22,72
-5 en Medio 2	50	83,33	10	16,66
-5 en Medio 3	36	57,14	27	42,85
-4 en Medio 1	101	96,19	4	3,81
-4 en Medio 2	88	83,81	17	16,19
-4 en Medio 3	88	88,88	11	11,11

Como se muestra en la tabla 5, en todos los tratamientos hay formación de callos embriogénicos, pero el porcentaje de respuesta varía entre ellos. Adicionalmente se observó que la probabilidad de formación de callos embriogénicos en los ovarios de la etapa de madurez -5 con 300 μ M de 2,4-D y 0,25% de carbón activado fue estadísticamente mayor (42,9%) que los otros tratamientos evaluados, mientras que el tratamiento con menor probabilidad de inducción de embriones somáticos fue -4 con 100 μ M de 2,4-D y 0,1% de carbón activado con un porcentaje del 3,8%.

En la misma tabla (Tabla 5) los valores obtenidos indican que con la inflorescencia -5 independientemente del medio utilizado hay mayor formación de estas estructuras en comparación con la edad -4.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza de máxima verosimilitud para datos no categóricos, observándose diferencias significativas tanto para la edad como para el medio. (Tabla 6.)

Tabla 6. Análisis de varianza de máxima verosimilitud para datos no categóricos.

Fuente	D.F.	Chi - Cuadrado	Pr > ChSq
Edad	1	20,87	< 0,0001
Medio	2	8,62	0,0135
Edad*Medio	2	11,10	0,0039

A diferencia de los resultados observados en la Tabla 4, con este tipo de análisis se detecta la interacción edad x medio, lo que nos permite identificar que los ovarios provenientes de la inflorescencia de edad -5 sembrados en el medio 3, es el mejor de los tratamientos, en donde la probabilidad de formación de callos embriogénicos es del 42,85% (Figura 10).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, el porcentaje de formación de callos embriogénicos es similar a los reportados por Perera *et al.*, (2007), en donde lograron obtener hasta un 41% de callos embriogénicos a partir de ovarios inmaduros.

En contraste a los resultados obtenidos en este trabajo, *et al.*, (2007), obtuvo este porcentaje de encallosamiento a partir de ovarios provenientes de inflorescencias con edad -4 extraídos de cultivares altos de Sri Lanka, los cuales fueron sembrados en medio 72 con 100 μ M de 2,4-D y 0,1% de carbón activado, que comparado con los resultados obtenidos en este estudio es precisamente en este tratamiento donde se lograron los resultados más bajos de callogénesis.

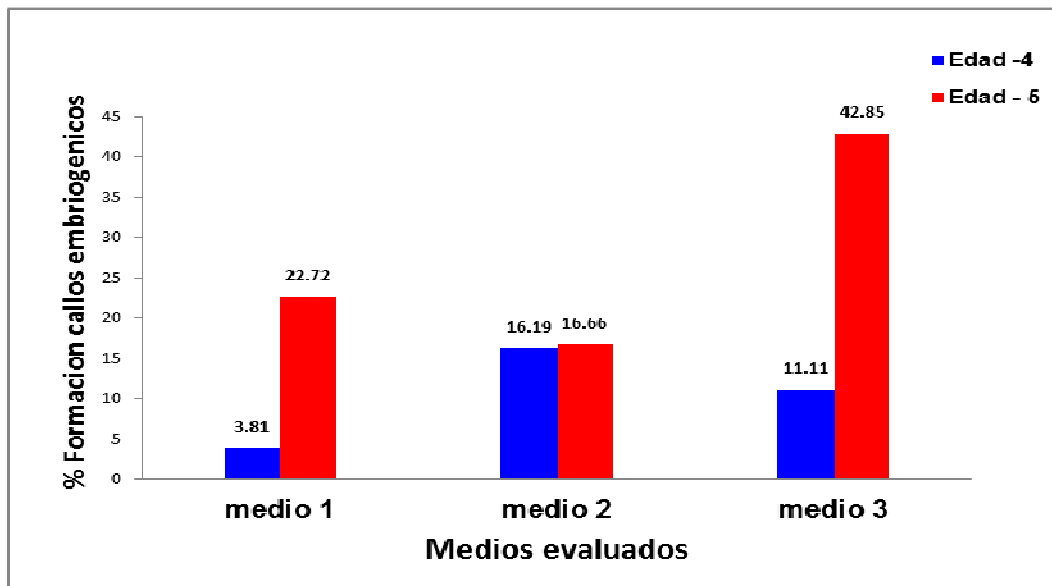


Figura 10. Porcentaje de callos embriogénicos obtenidos a partir de ovarios inmaduros de dos edades sembrados en 3 medios con concentraciones de 2,4-D y de carbón activado (C.A.) diferentes.

Hay que tener en cuenta que el efecto del genotipo es determinante en la respuesta embriogénica, lo que ha impedido definir un protocolo particular que se pueda aplicar en forma general para esta especie. Además, actualmente se conocen pocos protocolos estandarizados para la embriogénesis somática en especies relacionadas a *C. nucifera*, como es el caso del dátil (Fki *et al.*, 2003; Eke *et al.*, 2005; Eshraghi *et al.*, 2005).

Por ejemplo Verdeil *et al.* (1994), encontraron respuesta diferencial al 2,4-D durante la etapa de formación de callos embriogénicos en tres genotipos de coco utilizados. Lo anterior probablemente está relacionado con la alta diversidad genética presente en los miembros de esta familia de plantas, que se ve acentuada por el hecho de propagarse por semilla, producto muchas veces de un proceso de polinización abierta, el cual predomina sobre la propagación vegetativa (Elshibli and Korpelainen, 2008).

El logro más importante de este trabajo fue la identificación del tipo de explante, la mejor edad de inflorescencia y la mejor combinación de regulador de crecimiento y carbón activado como un primer acercamiento de un proceso

de regeneración por medio de la obtención de callos embriogénicos en materiales híbridos de coco a partir de inflorescencias inmaduras.

Por lo tanto, las investigaciones a futuro se orientarán hacia la optimización para la inducción y maduración de callos embriogénicos a partir de explantes provenientes de inflorescencias inmaduras con el fin de desarrollar un protocolo eficiente de propagación masiva de materiales híbridos de coco, una necesidad creciente para la industria.

7. CONCLUSIONES

- En este estudio se encontró que el explante viable para la producción de callos embriogénicos de materiales híbridos de coco es el ovario. Sin embargo, aunque con este tipo de explante se obtuvieron los mejores resultados, la cantidad de ovarios es muy escasa.
- Respecto a los explantes utilizados en el análisis, las anteras no son viables para la formación de callos embriogénicos en el medio 72, o su viabilidad es tan baja que con los tamaños de muestra considerados no fue posible detectarlos.
- Este estudio indica que la formación de callos embriogénicos fue constante y superior en la inflorescencia de edad -5 en comparación a las demás edades evaluadas. La respuesta de formación de este tipo de estructuras fue variable de acuerdo a cada uno de los tratamientos.
- Se logró evidenciar que existen diferencias significativas entre las concentraciones de 2,4-D y carbón activado utilizadas. El medio compuesto por 300µM de 2,4-D y 0,25% de carbón activado presentó los valores más altos en la producción de callos embriogénicos.
- En lo que respecta a los tratamientos, el mejor resultado se obtuvo con los ovarios provenientes de la edad -5 sembrados en medio con concentración de 300µM de 2,4-D y 0,25% de carbón activado, arrojando un porcentaje de formación de callos embriogénicos del 42,9%.
- La edad de la inflorescencia en la que menor cantidad de formación de callos embriogénicos se obtuvo fue -3. Se comprueba que la madurez del explante es un factor determinante para la producción de este tipo de estructuras.

- Se pudo determinar que la callogénesis embriogénica en coco es el resultado de la acción de varios factores como la composición del medio de cultivo, la naturaleza del explante, el efecto del genotipo y los factores genéticos, los cuales trabajan sistemáticamente.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios histológicos y seguimiento de los tipos de callos, para tener un mayor conocimiento referente a los procesos de la embriogénesis somática que permitan ampliar el entendimiento de este fenómeno.
- Mantener los callos embriogénicos obtenidos, para estudiar su potencial de germinación y hacer un seguimiento de este material para observar su conformidad genética.
- Es importante identificar otros tipos de explante dentro de la inflorescencia -5, ya que aunque en esta edad se obtienen mejores resultados para formar callos embriogénicos, la cantidad de ovarios es muy escasa.
- Es importante identificar y cuantificar la acción que ejerce el carbón activado en el medio para saber cuánto retiene del regulador de crecimiento.
- Efectuar estudios con marcadores moleculares entre la planta madre y los callos embriogénicos, con el fin de certificar que las estructuras obtenidas sean clones de la planta donante y evitar eventos de variación somaclonal.
- El hecho de haber obtenido callos embriogénicos en materiales híbridos de coco a partir de inflorescencias abre la posibilidad de optimizar los protocolos y a futuro mejorar la escala de multiplicación clonal para esta nuez. Por ende se debe continuar la investigación, tendiente a lograr un protocolo eficiente de multiplicación clonal.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. P.; Do, N.; and Ge-lin, C. 1992. Preservation of DNA in plant specimens from tropical species by desiccation. Pp. 153-181 *in*: RP Adams and JE Adams (Eds). Conservation of plant genes. *In*: DNA banking and *In vitro* biotechnology. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic, San Diego, p 948.
- Al-Khayri, J. M. and Al-Bahrany, A. M. 2004. Genotype-dependent *In vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. *Sci Hort* 99(2):153–162.
- Ângelo, P. C. da S.; Leal, M. L.; Gomes, K. K. P. 2003. Cultivo *In vitro* de embriões zigóticos provenientes de variedades brasileiras de coco (*Cocos nucifera* L.). *Ciência Rural*, v.8, p.66-72.
- Arunachalam, V.; Jerad, B. A.; Damodarn, V.; Ratnambal, M. J.; Kumaran, P. M. 2005. Phenotypic diversity of foliar traits in coconut germplasm. *Genetics Resources and Crop Evolution* 52: 1031-1037.
- Ashburner, G.R.; Thompson, W. K.; Halloran, G. M.; and Foale M. A. 1997. Fruit component analysis of South Pacific coconut palm populations. *Genetic resources and crop Evolution* 44: 327-335.
- Ashburner, G.R and Harries, H.C. 2000. Identifying markers for domestic-type coconut palms in segregating populations by applying generalized linear models to genetic resource data. *In*: Proceedings of the 11th Australian Plant Breeding Conference, pp. 34-40.
- Assy-Bah, B.; Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-Letters*, v.13, p.117-126.
- Assy-Bah, B.; Engelmann, F. 1993. Medium-term conservation of mature embryos of coconut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.33, p.19-24.
- Avise, J., C. 1994. Molecular markers, Natural History and Evolution. List end Chapmas y Hall. New York. pp. 511.
- Azpeitia, M. A.; Saenz, C. L.; Chan, J. L.; Oropeza, S. C. 2003. Inducción de embriones somáticos en explantes de plúmula de coco por ácido abscísico y polietilenglicol. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 26 (4): 309 – 318.
- Barker, J. H. A.; Teulat B.; Lebrun P.; Baudouin, L.; Karp, A.; & Rognon F. 2000. Coconut microsatellite markers and their use for genebank organization and genetic mapping. *Abstract from the International Plant & Animal Genome Conference VIII, San Diego, California, USA, January 2000.*

- Batugal, P.; Ramanatha Rao, V. and Oliver J., editors. 2005. Coconut Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia.
- Baudouin, L y Lebrun, P. 2002. The development of microsatellite kit for use with coconuts. Burotrop Bulletin 17: 16-20.
- Baudouin, L.; Lebrun, P.; Konam, J. L.; Ritter, E.; Berger, A. and Billotte, N. 2006. QTL analysis of fruit components in the progeny of a Rennell Island Tall coconut (*Cocos nucifera* L.) individual. Theor Appl Genet 112: 258-268.
- Baudouin, L; Lebrun, P. 2009 Coconut (*Cocos nucifera* L.) DNA studies support the hypothesis of an ancient Austronesian migration from Southeast Asia to America. Genet. Resour. Crop. Evol. 56:257–262.
- Beckmann, J. S. and Soller M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. Euphytica 35: 111-124.
- Benkirane, H.; Sabounji, K.; Chlyah, A. and Chlyah, H. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. Plant Cell Tissue Organ Cult 61(2):107–113.
- Blake, J.; Hornung, R. 1995. Somatic embryogenesis in coconut. In: Jain S, Gupta P, Newton R (Eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer, Dordrecht, pp 327–349
- Bogtoff, P. H.; Balslev, H. 1993. Palmas útiles. Especies ecuatoriales para agroforesteria y extractismo. Ediciones ABYA-YALA. Quito, Ecuador. 158pp.
- Bohanec B.; Marijana J.; Alojz I.; Branka J. 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) induction procedures and genetic analysis of regenerents. Plant Sci 104:215–224
- Borchsenius, F.; Moraes R.M. 2006. Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. *Botánica Económica de los Andes Centrales*: 412-433.
- Borges, M.; Portales, S.; Malaurie, B. 2005. Influencia de diferentes concentraciones de sacarosa en el cultivo *In vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.). Taller internacional de biodiversidad, biotecnología y agricultura sostenible. Convención U.D.G. 2005. pp. 76-84.
- Borges, M. and Garces, Y. 2006. Efecto de la adición de distintas concentraciones de cachaza en el suelo sobre la propagación de *Cocos nucifera* L. Revista Centro Agrícola 33 (1), 9-14.

- Brackpool, A.L.; Branton, R.L.; Blake, J. 1986. Regeneration in palms. In: Vasil IK (Ed) Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol 3. Academic Press, New York, pp 207–222
- Brown, D. C. W., and T. A., Thorpe. 1995. Crop improvement through tissue culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology 11 (4): 409-415.
- Buckley, Ralf; Harries, Hugh. 1984. Self-sown wildtype coconuts from Australia. Biotropica. 16(2): 148-151.
- Buffard - Morel J., Verdeil J.L.; Pannetier C. 1988. Vegetative propagation of coconut palm through somatic embryogenesis, obtention of plantlets from leaf explant. In: Durand G.; Bobichon L., Florent J (Eds) Proceedings of the 8th international biotechnology symposium, Paris, p 117.
- Calamar, A.; Klerk, G. J. de. 2002. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.70, p.207-212.
- Calva, C. G.; Ríos L. E. 1999. Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.
- Chan J. L.; Saenz, L.; Talavera, C.; Hornung, R.; Robert, M.; Oropeza, C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 17:515– 521.
- Chan, E., and Elevitch, C. R. 2006. *Cocos nucifera* (coconut), ver. 2.1. In: Elevitch, C.R. (Ed.). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Hōlualoa, Hawaii. <<http://www.traditionaltree.org>>.
- Chinchilla, C. M.; Duran, N. 1998. Epidemiología y manejo integrado del anillo rojo en palma aceitera. Una perspectiva agronómica. Palmas (CO) 19: 242 - 256.
- Chinchilla, C. 2003. Manejo integrado de problemas fitosanitarios en palma aceitera *Elaeis guineensis* en América Central. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 67 p. 6 9 - 8 2.
- Christianson, M. L., Warnick, D. A., y Carlson, P. S. 1983. A Morphogenetically Competent Soybean Suspension Culture. Science. 22: 632 – 634.
- Cooke, T. J.; Poli, D.; Sztein, A. E. y Cohen, J. D. 2002. Evolutionary patterns in auxin action. Plant Molecular Biology. 49 (3-4): 319 – 338.

- Corner, E.J.H. 1966. The natural history of palms. Berkeley, CA: University of California Press. 393 p.
- Coto, O. 2005. Tendencias actuales del mejoramiento genético de la uva (*Vitis spp.*). Citrifrut 22 (1): 31-37
- Das Neves, L.; Duque, J.; de Almeida J.; y Feveriro, P. 1999. Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* spp. Narbonensis and *M. truncatula* Geartn cv. Jemalong. Plant Cell Reports. 18: 398 – 405.
- Dawson, I. K.; Hedley, P. E.; Guarino, L. and Jaenicke, H. 2009. Does biotechnology have a role in the promotion of underutilised crops? Food Policy 34: 319–328.
- De Jong, A. J.; Schmidt, E.D.L.; y de Vries, S. C. 1993. Early events in higher-plant embryogenesis. Plant Mol. Biol. 22: 367 – 377.
- Dhlamini, Z., 2006. The Role of Non-GM Biotechnology in Developing World Agriculture. Science and Development Network (SciDev.Net), Policy Briefs. <<http://www.scidev.net/dossiers/index.cfm?fuseaction=policybrief&policy=114&dossier=6>>.
- Dodeman, V.L.; Ducreux, G.; and Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. J Exp Botany 48 (313):1493-1509.
- Eke, C. R.; Akomeah, P. and Asemota, O. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'Zebia' and 'Loko' landraces. *African Journal of Biotechnology* 4: 244-246.
- Elliot M.; Broschat T.; Uchida J.; Simone G. 2004. Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders. The American Phytopathological Society. 61 p.
- Elshibli, S. and Korpelainen, H. 2008. Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica* 134: 251-260.
- Endemann, M.; y Wilhelm, E. 1999. Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur* L. *Biologia Plantarum*. 42: 499 - 504.
- Engelmann, F.; Batugal, P. A. 2002. Background on the development and implementation of the coconut embryo *In vitro* culture project. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P. A.; OLIVER, J. (Ed.). Coconut embryo *In vitro* culture. Malaysia: IPGRI-APO, 2002. V.2. p.1-4.
- Engelmann, F. 2005. *In vitro* collecting of coconut germplasm. En: Batugal, P.; Ramanatha, V.; Oliver, J. (eds.). Coconut genetics resources. IPGRI-APO, Serdang, Selangor DE, Malaysia.

- Eshraghi, P.; Zarghami, R. and Mirabdulbaghi, M. 2005. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. *African Journal of Biotechnology* 4: 1309-1312.
- Etienne-Barry, D.; Bertrand, B.; Vasquez, N.; y Etienne, H. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports*. 19: 111 – 117.
- FAO. 2004a. Preliminary Review of Biotechnology in Forestry, Including Genetic Modification. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E. Forest Resources Development Service, Forest Resources Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO. 2004b. The State of Food and Agriculture, 2003–2004. Agricultural Biotechnology: Meeting the Needs of the Poor? FAO Agriculture Series No. 35. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Fehér, A.; Taras, P.; Pasternak, P.; Dudits, D. 2003. Transition of Somatic Plant Cell to an Embryogenic State. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.
- Ferl, R.; Paul A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- Fernando, S. C. and Gamage, C. K. A. 2000. Absciscic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Sci* 151:193–198.
- Fernando, S. C.; Verdeil, J. L.; Hoher, V.; Weerakoon, L. K. and Hirimburegama, K. 2003. Histological analysis of regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72:281–284.
- Ferreira, J. M. S.; Warwick, D. R. N. and Siqueira, L. A. 1998. A cultura do coqueiro no Brasil. 2ª. Edição. Brasília: Embrapa-SPI; Aracaju: Embrapa - CPATC. 292 p.
- Figueroa A. y Ruiz J. 2002. Manual para el establecimiento y manejo de viveros y plantaciones de cocotero. Honduras. 12 p.
- Fki, L.; Masmoudi, R.; Drira, N. and Rival, A. 2003. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Reports* 21: 517-524.
- George E. F.; Sherrington P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegenetics Eversley, London, pp 387–389.

- George, E. F. 1996. Micropropagation in practice. *In: Plant propagation by tissue culture Part 2. Exegetics Limited, London, UK. Pp 834-1236.*
- Gerber, K. and Giblin-Davis, R. 1990. Association of red ring nematode and other nematode species with the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *Journal of Nematology* 22:143-149.
- Granados-Sánchez; D.; López-Ríos G. 2002. Manejo de la Palma de Coco en México. Universidad Autónoma de Chapingo. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, Enero-Junio, año/Vol. 8, N° 001.
- Gray, D. 2000. Nonzygotic embryogenesis. *In* Trigiano, R; Gray, D. eds. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. USA, CRC Press. P. 175 – 190.
- Griffith, R. 1987. Red ring disease of coconut palm. *Plant Dis.* 71: 193-196.
- Guarino, L.; Ramanatha-Rao, V.; and Batugal, P. 1998. Collecting coconut genetic diversity: Elements of a strategy for COGENT germplasm collecting activities. Paper presented at COGENT meeting, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Gueye, B.; Morcillo, F.; Collin, M.; Gargani, D.; Overvoorde, P.; Aberlenc-Bertossi, F.; Tranbarger, T. J.; Sane, D.; Tregear, J. W.; Borgel, A. and Verdeil, J-L. 2009. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 35-45.
- Guo, Y. D.; Sewon, P. and Pulli, S. 1999. Improved embryogenesis from anther culture and plant regeneration in timothy. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 57: 85–93
- Gurel S.; Gurel E.; Kaya Z. 2000. Double haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L). *Plant Cell Rep* 19:1155–1159.
- Hanold, D. and Randles J. W. 1991. Cadang - cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis.* 75:33-335.
- Harries, H.C. 1978. The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *The Botanical Review* 44, 3, p. 265-319.
- Harrison, N. A.; Cordova, I.; Richardson, P. and Dibonito, R. 1999. Detection and diagnosis of lethal yellowing. Pp. 183-196. *In: Oropeza, C.; Verdeil, J. L.; Ashburner, G. R.; Cardena, R. and Santamaria, J. M. (Eds). Current advances in coconut biotechnology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.*
- Herrán, A.; Estioko, L.; Becker, D.; Rodríguez, M. J. B. and Rohde, W. 2000. Linkage mapping and QTL análisis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Theor Appl Genet* 101: 292-300.

- Hodgkin, T.; Roviglioni, R.; de Vicente, M. C. and Dudnik, N. 2001. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. *Acta Horticulturae* 546: 107-118.
- Hornung R. 1995. Initiation of callogénesis in coconut palm (*Cocos nucifera* L.). In: Oropeza C., Howard F.W., Ashburner G.R. (Eds) Lethal yellowing: research and practical aspects. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 203–215.
- Hussey, G. 1983. *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops. In “*Plant Biotechnology*”. Ed. Mantell, S. H. Cambridge University Press: Cambridge. Pp. 111 – 38.
- Ibaraki, Y.; y Murata, K. 2001. Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65(3): 179 – 199.
- Jeannin, G., Charriere, F., Bronner, R., y Hahne, G. 1998. Is Predetermined Cellular Competence Required for Alternative Embryo or Shoot Induction on Sunflower Zygotic Embryos? *Bot. Acta*. 11: 280 – 286.
- Jiménez, V. 2001. Regulation of *In vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R Bras Fisiol Veg*. 13(2):196- 223
- Justin S. H. F. W. 1978. Vegetative propagation of coconuts. Report East Malling Research Station, 1977, pp 75–176.
- Karp, A. 2002. The new genetic era: Will it help us in managing genetic diversity? Pp. 43-56. In: J.M.M. Engels, V Ramanatha Rao, A.H.D. Brown and M.T. Jackson (Eds). *Managing plant genetic diversity*. CAB International and IPGRI, Wallingford and Rome.
- Karunaratne, S.; Periyapperuma, K. 1989. Culture of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.): callus proliferation and somatic embryogenesis. *Plant Sci* 62:247–253.
- Kielly, G.; y Bowley, S. 1992. Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome*. 35: 474 – 477.
- Kohlenbach, H. 1985. Fundamental and Applied Aspects of *In vitro* Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis. In. Nijhoff, M; Junk, W. Eds. *In vitro* Techniques, Propagation a Long Term Storage.
- Krikorian, A. D.and Berquam, D. L. 1969. Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *Revista Botánica*. 35 59 – 88.
- Lebrun, P.; Ncho, Y. P.; Seguin, M.; Grivest, L. and Baudouin, L. 1998. Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Euphytica* 101:103-108.

- Lebrun, P.; Baudouin, L.; Bourdeix, R.; Konan J. L.; Barker, J. H.; Aldam, C.; Herran, A. and Ritter, E. 2001. Construction of a linkage map of the Rennell Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters. *Genome* 44:962-70.
- Litz R. E.; Chavez V. M.; Moon, P.A. 1998a. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. Recent Advances in Biotechnology for tree Conservation and management. Proceeding of IFS Workshops 232 – 243.
- Litz, R. E.; Hemdrix, R. C.; Moon, P.A.; Chavez V. M. 1998b. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4-D and embryogenic nurse culture. *Plant Cell, tissue and organ culture*. 53: 13 – 18.
- Loria, M. J. L. 1993. verde palma. Galería del 4 al 31 de Octubre. Dirección general de Extensión, Departamento de Difusión Cultural de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.
- Luthar Z.; Bohanec B. 1999. Induction of direct somatic embryogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Rep* 18:797–802.
- Magalhaes, J. A. S.; de Moraes- Neto, A. H. A. and Miguens, F. C. 2008. Nematodes of *Rhynchophorus palmarum*, L. (Coleoptera: Curculionidae), vector of the Red Ring disease in coconut plantations from the north of the Rio de Janeiro State. *Parasitol. Res.* 102:1281–1287
- Magnaval, C.; Noirotj, M.; Verdeil, J. L.; Blattes, A.; Huet, C.; Grosdemange, F.; Beule, T.; and Buffard-Morel, J. 1997. Specific Nutritional Requirements of Coconut Calli (*Cocos nucifera* L.) during Somatic Embryogenesis Induction. *Plant Physio(.* W. 150. pp. 719-728 (1337).
- Malaurie, B.; Bandupriya, H. D. D.; Fernando, S. C.; and Verdeil, J. L. 2006. Optimisation du procede de cryoconservation de la plumule de cocotier. *Les Actes du BRG 6*, 449-468.
- Manzanilla, M. A. 2004. Induccion de embryogenesis somatic de tejido nuclear de tres variedades de mango (*Mangifera indica* L.). Universidad de Colima, México.
- Martinelli, L.; Candioli, E.; Costa, D.; Poletti, V.; Rascio, N. 2001. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. *Plant Cell Rep.* 20:279–284.
- Meerow, A. W.; Wisser, R. J.; Brown, S. J.; Kuhn, D. N.; Schnell, R. J. and Broschat, T. K. 2003. Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite

DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. TAG Theoretical and Applied Genetics 106 (4): pp. 715-726.

- Menon, K. P. V.; Pandalai, K. M. 1958. The coconut palm: A monography. Ernakulan, Indian Central coconut Committee. 384 pp.
- Merkle, S. A. 1990. Maturation of yellow-polar somatic embryos. In: Ahuja, M. R. (Ed), Proceedings of the IUFRO-NATO Advanced Research Workshop on Woody *Plant Biotechnology*. Plenum Press, New York.
- Merkle, S. A.; y Battle, P. J. 2000. Enhancement of embryogenic culture initiation from tissues of mature sweetgum trees. Plant Cell Reports. 19: 268 – 273.
- Mordhorst, A. P.; Toonen, M. A. J.; y de Vries, S. C. 1997. Plant Embryogenesis. Critical Reviews in Plant Sciences. 16(6): 535 – 576.
- Morikawa, T. and Leggett, J. M. 1990. Isozyme polymorphism in natural populations of *Avena canariensis* from the Canary Islands. Heredity 64: 403-411.
- Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473 – 497.
- Nanden-Amattaram, T. L. and Parsadi-Sewkaransing, M. 1989. Some preliminary observations on the occurrence of *Phytomonas* flagellates in coconuts from coconut palm (*Cocos nucifera* L.) infected by 'hartrot' disease in Suriname. Surinaamse Landbouw 37:14-20.
- Naylor, R. L.; Falcon, W. P.; Goodman, R.M.; Jahn, M. M.; Sengooba, T.; Tefera, H. and Nelson, R. J. 2004. Biotechnology in the developing world: a case for increased investments in orphan crops. Food Policy 29, 15–44.
- Nogan, K.; Rose, R.; Gorst, J. 1989. Regeneration of *Medicago truncatula* from regenerated plants. Plant Cell Reports. 8: 278 – 281.
- Nomura, K.; y Komamine A. 1985. Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspensión culture Plant Physiology. 79: 988 – 991.
- Ohler J. G. 1999. El cocotero árbol de vida. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. 47 p.
- Opeke, Lawrence K. 1982. Tropical tree crops. Chichester, UK: John Wiley and Sons. 312 p.

- Oropeza, C.; Cordova, I.; Chumbal, A.; Narvaez, M.; Saenz, L.; Ashburner, R. and Harrison, N. 2011. *Phytoplasma* distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Ann. Appl. Biol.* 159:109-117
- Pan, M.J. and Staden, J.V. 1998. The use of charcoal in *In vitro* culture. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Parrotta, John A. 1993. *Cocos nucifera* L. Coconut, coconut palm, palma de coco. SO-ITFSM- 57. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 7 p.
- Pech, A.; Maust, B.; Orozco-Segovia, A.; Oropeza, C. 2007. The effect of gibberellic acid on the *In vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 43, 247- 253.
- Perera, L.; Russell, J. R.; Provan, J.; McNicol, J. W. y Powell, W. 1998. Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling. *Theoretical and Applied Genetics*, 96 (3-4): 545 – 550.
- Perera, L.; Russell, J. R.; Provan, J. y Powell, W. 2001. Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L., var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica*, 122 (2): 381 - 389
- Perera, L; Russell, J. R.; Provan, J.& Powell, W. 2003. Studying genetic relationships among coconut varieties/populations using microsatellite markers. *Euphytica* 132: 121–128.
- Perera, P. I. P.; Hoche V.; Verdeil, J. C.; Doubeau S.; Yakandawala, D. M. D.; Weerakoon, L. K. 2007. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* (2007) 26:21–28.
- Perera, P. I. P.; Hoche, V.; Verdeil, J. L.; Bandupriya, H. D. D.; Yakandawala, D. M. D. and Weerakoon, L. K. 2008. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 92:293–302.
- Perera, P. I. P.; Vidhanaarachchi, V. R. M.; Gunathilake, T. R.; Yakandawala, D. M. D.; Hoche V.; Verdeil J. L.; & Weerakoon L. K. 2009. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 99:73–81.
- Pérez-Núñez, M. T.; Chan, J. L.; Sáenz, L.; González, T.; Verdeil, J. L.; and Oropeza C. 2006. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* (L.) Plumule explants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 42: 37-43.
- Quero, H. J. 1994. Flora de Veracruz. Fascículo No. 81 PALMAE. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz. 118 pp.

- Raemakers, C. J. M.; Jacobsen, E.; Visser, R. G. F. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93–107.
- Reynolds, T.L. 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 33(1):1-10.
- Ribeiro, E. F.; Soares, A. R. y Ramalho, M. A. P. 1999. Divergencia genética entre populações de coqueiro-gigante do Brasil. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 34 (9): 1615-1622.
- Roca M. M. 2005. Antecedentes del Amarillamiento Letal del Cocotero en Honduras. Zamorano. EAP.
- Rohde, W.; Becker, D.; Kullaya, A.; Rodríguez, J.; Herran, A. and Ritter, E. 1999. Analysis of coconut germplasm biodiversity by DNA marker technologies and construction of a genetic linkage map. In: *Current Advances in Coconut Biotechnology*. (Oropeza, C.; Verdeil, J. L.; Ashburner, G. R.; Cardeha, R. and Santamana, J. M., Eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 99-12
- Ruth S. K.; Stephen L. S.; John C.B. 1993. Ovule culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and closely related species. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 32:77–82.
- Sáenz, L.; Herrera-Herrera, G.; Uicab-Ballote, F.; Chan J. L. and Oropeza, C. 2010. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* (2010) 100:301–308.
- Samsudeen, K.; Jacob, P. M.; Nirali, V.; Kumaran, P. M. and Salooja, R. 2006. Exploration and collection of coconut germplasm in Kadmat and Amini Islands of Lakshadweep, India. *Crop Resources and Crop Evolution* 53: 1721-1728.
- Santana, M. C.; Teixeira, S. L. 2004. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *In vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). *Biologia Geral e Experimental*, v.5, p.30-33.
- Santos, G. A. 1999. Potencial use of clonal propagation in coconut improvement programs. In: Oropeza C.; Howard F. W.; and Ashburner G. R. (Eds). *Lethal yellowing research and practical aspects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. Pp 419-430.
- Sharp, W. R.; Sondahl, M. R. Caldas, L. S. y Maraffa, S. B. 1980. The physiology of *In vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews*. 2: 268 - 310
- Silva, A. T. da; Pasqual, M.; Ishida, J. S.; Antunes, L. E. C. 1995. Acimação de plantas provenientes da cultura *In vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.30, p.49-53.

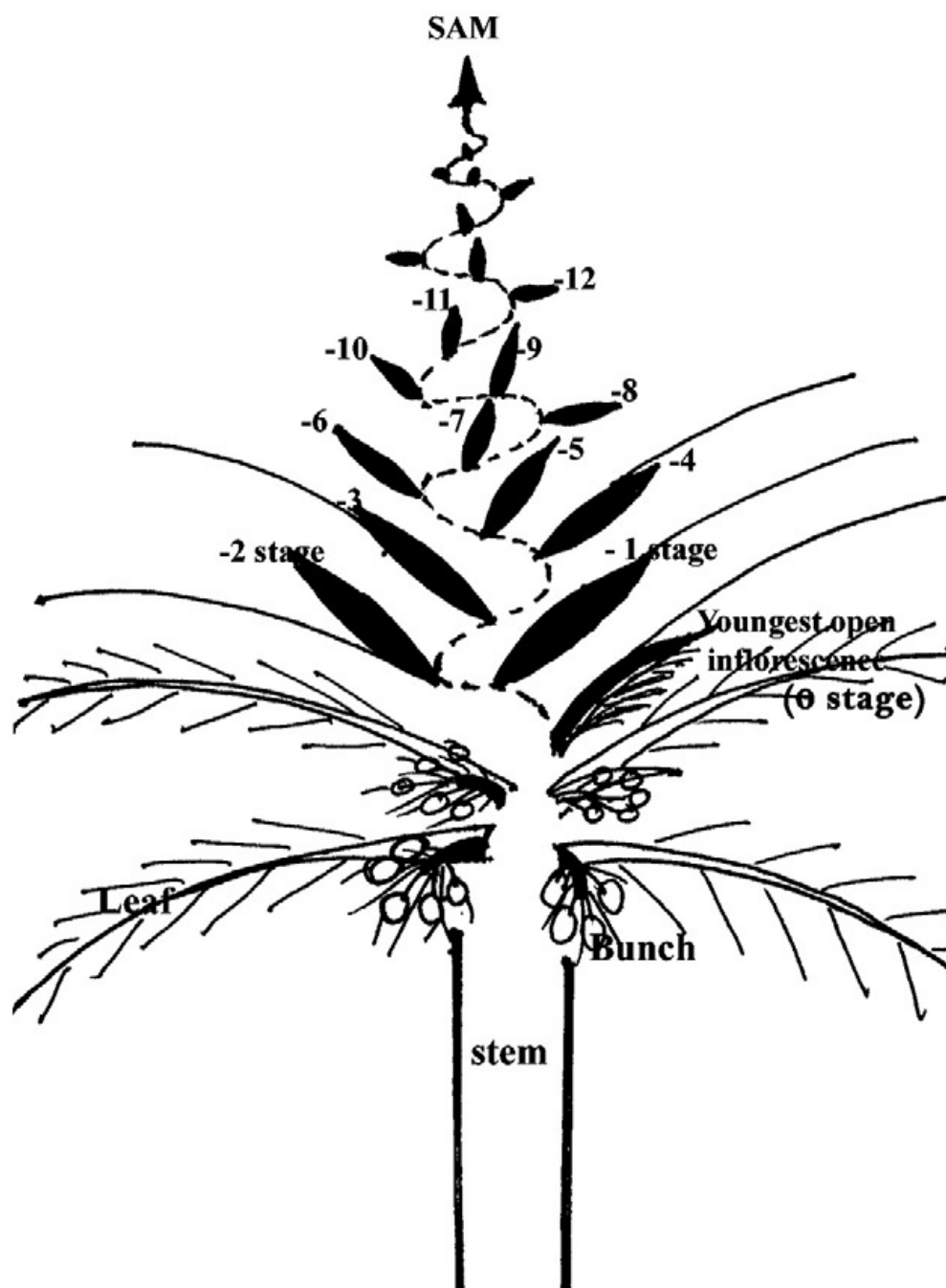
- Silva, V. dos S. 2002. Regeneração *In vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 78p.
- Siqueira, E. R.; Ribero, F.E.; Aragao, W. M.; Tupinamba, E. A. 1998. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A. (Ed.). Cultura do coqueiro no Brasil. Aracaju: Embrapa-CPATC, p.73-95.
- Smith, M. K., y Drew, R. A. 1990. Current Applications of Tissue Culture in Plant Propagation and Improvement. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 23: 135 – 142.
- Souza Junior, E.E. de; Barboza, S. B. S. C.; Souza, L. A. C. 2001. Efeito de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. pérola. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.31, p.147-151.
- Steinmacher, D. A.; Clement, C. R. and Guerra, M. P. 2007. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89:15–22
- Street H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
- Sticklen, M.B., 2008. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Genetics* 9, 433–443.
- Sugimura, Y.; Itano, M.; Salud, C. D.; Otsuji, K. and Yamaguchi, H. 1997. Biometric analysis on diversity of coconut palm: Cultivar classification by botanical and agronomical Traits. *Euphytica* 98(1-2): 29-35.
- Takeda, S. and Matsuoka, M. 2008. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nature Genetics* 9, 444–457.
- Talavera, C.; Contreras, F.; Espadas, F.; Fuentes, G.; Santamaria, J. M. 2005. Cultivating *In vitro* coconut palms (*Cocos nucifera*) under glasshouse conditions with natural light, improves *In vitro* photosynthesis nursery survival and growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.83, p.287-292.
- Teixeira, J. B.; Sondahl, M. R.; Nakamura, T.; Kirby, E. G. 1995. Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 40(2): 105–111.
- Terzi, M. and Lo Schiavo, F. 1990. Somatic embryogenesis. In: Bhojwani, S.S. (Ed). *Plant tissue culture: applications and limitations*. The Netherlands: Elsevier. pp. 54-66.

- Teulat, B.; Aldam, C.; Trehin, R.; Lebrun, P.; Barker, J. H. A.; Arnold, G. M.; Karp, A.; Baudouin, L. and Rognon, F. 2000. An análisis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (5): 764-771.
- Unnevehr, L.; Pray, C. and Paarlberg, R. 2007. Addressing micronutrient deficiencies: alternative interventions and technologies. *Ag. Bio. Forum* 10, 124–134.
- Upadhyay, A.; Jose, j.; Manimekalai, R.; and Parthasarathy, V. A. 2002. Molecular Analysis of Phylogenetic Relationships among Coconut Accessions. *Managing Plant Genetic Diversity*
- Van Creij M. G. M.; Kerckhoffs D. M. F. J.; De Bruijn S.M.; Vreugdenhil D.; Van Tuyl J. M. 2000. The effect of medium composition on ovary slice culture and ovule culture in interspecific *Tulipa gesneriana* crosses. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 60:61–67
- Van Tuyl J. M.; Van Dien M. P.; Van Creij M. G. M.; Van Kleinwee T. C. M.; Franken J.; Bino R. J. 1991. Application of *In vitro* pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci* 74(1):115–126
- Vasic, D.; Alibert, G.; Skoric, D. 2001. Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). *Plant Cell Rep.* 20:121–125.
- Vengadesan, G.; Ganapathi, A.; Anand, R.P. and Anbazhagan V.R. 2002. *In vitro* propagation of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. Via. cotyledonary nodes. *Agroforestry Systems*, 55: 9–15.
- Verdeil J.L.; Huet C.; Grosdemange F.; Buffard-Morel J. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 13:218–221.
- Vidhana, V. R. M.; and Weerakoon, K.. 1997. Callus induction and direct shoot formation in *In vitro* cultured immature inflorescence tissues of coconut. *Cocos*, 12,39 – 43.
- Viñas, M. y Jiménez, V. M. 2011. Factores que influyen en la embriogénesis somática *In vitro* de palmas (Arecaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIII No. 2. 229-242
- Von Arnold, S.; Sabala, I.; Bozhkov, P.; Dyachok, J.; Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69:233–249.

- Weerakoon L.K. 2004. Coconut tissue and embryo culture in Sri Lanka: current developments and future challenges. In: Peiris T. S.G.; Ranasinghe C. S. (Eds) Proceedings of the international conference of the Coconut Research Institute of Sri Lanka – Part 1 (Review papers and guest presentations). CRI, Lunuwila, Sri Lanka pp 41–61.
- Williams, E. G. y Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 443-462.
- Xing, G. M.; Li, S.; Cui, K. R. y Wang, Y. F. 2000. Mechanisms of plant somatic embryogenesis. *Progress in Natural Science*. 10(9): 641 – 649.
- Zelditch, M. L.; Swiderski, D. L.; Sheets, D. H. & Fink, W. L. 2004. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, London
- Zimmerman, J. L. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*. 5: 1411-1423.
- Zizumbo Villarreal, D. and Arellano-Morin, J. 1998. Germination patterns in coconut populations (*Cocos nucifera* L.) in Mexico. *Genetics Resources and Crop Evolution* 45:465-473.
- Zizumbo D.; Fernandez M.; Torres N.; and Cardeña R. 1999. Lethal yellowing resistance in coconut germplasm from México. *In*: Oropeza C.; Verdeil J. L.; Ashburner G. R.; Cardeña R.; and Santamaría J. (eds). Current advances in coconut biotechnology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 131-144.
- <http://data.gbif.org/> (Consultado en línea el 21 de Agosto de 2012)
- <http://www.cohibra.com.br/> (Consultado en línea el 16 de Marzo de 2012).

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama esquemático que indica el desarrollo de espádices dentro de la corona de la palma de coco.



Anexo 2. Componentes del medio 72. (Karunaratne y Periyapperuma, 1989)

Macronutrientes		
Componentes	Concentración Milimolar (mM)	Concentración mg/l
NH ₄ NO ₃	20	1600.8
KNO ₃	20	2022
Na H ₂ PO ₄ 2H ₂ O	2	312.02
Mg SO ₄ 7H ₂ O	3	739.41
Ca Cl ₂ 2H ₂ O	3	441.03
Micronutrientes		
Componentes	Concentración Micromolar (μM)	Concentración mg/l
H ₃ BO ₃	150	9.27
Mn SO ₄ 4H ₂ O	100	22.3
Zn SO ₄ 7H ₂ O	40	11.5
Cu SO ₄ 5H ₂ O	1.5	0.374
Na ₂ Mo O ₄	1	0.206
Co Cl ₂ 6H ₂ O	1	0.237
Na ₂ SO ₄	650	92.32
Fe SO ₄ 7H ₂ O	100	27.8
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	100	40.82
KI	5	0.83
Vitaminas y Aminoácidos		
Componentes	Concentración Micromolar (μM)	Concentración mg/l
Myo- Inositol	600	108.09
Nicotinic Acid	40	4.92
Thiamine - HCl	40	13.49
Pyridoxin - Hcl	6	1.23
D-Ca- Pantothenate	5	1.19
Riboflavin	10	3.76
Ascorbic Acid	10	1.76
L-Cysteine - HCl	120	18.91
Glycine	50	3.75